



Aus dem Lehrstuhl  
für  
Innere Medizin I  
Prof. Dr. med. Jürgen Schölmerich  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

Expression der Inflammasomkomponenten NALP2 und NALP3 in intestinalen  
Makrophagen bei Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Magdalena Margareta Maier

2009

<b>Dekan:</b>	<b>Prof. Dr. Bernhard Weber</b>
<b>1. Berichterstatter:</b>	<b>PD Dr. Florian Obermeier</b>
<b>2. Berichterstatter:</b>	<b>PD Dr. Stefan Farkas</b>
<b>Tag der mündlichen Prüfung:</b>	<b>28.04.2010</b>

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>7</b>
1.1 Aufbau der Darmwand .....	7
1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen .....	9
1.2.1 Morbus Crohn .....	10
1.2.2 Colitis ulcerosa.....	12
1.2.3 Ursachen der Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.....	13
1.3 Das angeborene Immunsystem .....	15
1.3.1 Entstehung und Aufgabe der Makrophagen .....	16
1.3.2 Differenzierung intestinaler Makrophagen .....	17
1.3.3 Intestinale Makrophagen bei Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.....	19
1.4 Die Erkennung mikrobieller Motive durch das angeborene Immunsystem..	20
1.4.1 Struktur und Funktion der NALPs .....	20
1.4.2 Aufbau und Funktion des Inflammasoms.....	22
1.4.3 Aktivatoren des Inflammasoms .....	24
 <b>2. Ziel der Arbeit .....</b>	 <b>26</b>
 <b>3. Material.....</b>	 <b>27</b>
3.1 Verbrauchsmaterial .....	27
3.2 Geräte .....	27
3.3 Material für die Isolation von Blutmonozyten und Darmmakrophagen ...	28
3.4 RNA -Isolation und cDNA-Gewinnung .....	28
3.5 Bestimmung des Proteingehalts .....	29
3.6 Taqman® PCR.....	29
3.7 Immunhistochemie .....	29
3.8 Westernblot.....	30
3.9 Antikörper.....	30
3.10 Puffer .....	31
3.11 Daten der verwendeten Makrophagen .....	32

<b>4. Methoden .....</b>	<b>33</b>
4.1 Isolation primärer Blutmonozyten.....	33
4.2 Isolation primärer humaner Darmmakrophagen.....	34
4.3 In-vitro differenzierte Makrophagen.....	35
4.4 Gesamt RNA-Isolation und Umschreiben in cDNA .....	35
4.5 Quantitative Taqman® PCR .....	36
4.6 Proteinbestimmung und Westernblot .....	39
4.6.1 Lyse der Monozyten und Makrophagen.....	39
4.6.2 Proteinbestimmung .....	40
4.6.3 Westernblot.....	40
4.7 Immunhistochemie .....	41
<b>5. Ergebnisse.....</b>	<b>43</b>
5.1 Quantitative Expression von NALP2 und NALP3 in Monozyten und Makrophagen aus gesunder versus chronisch entzündeter Darmmukosa..	43
5.2 Genexpression von NALP2 und NALP3 in in vitro differenzierten Makrophagen .....	46
5.3 Nachweis von NALP2 und NALP3 auf Proteinebene .....	50
5.3.1 Westernblot.....	50
5.3.2 Immunhistochemie.....	52
<b>6. Diskussion .....</b>	<b>55</b>
6.1 Quantitative Expressionsunterschiede von NALP2 und NALP3 in Monozyten und Makrophagen gesunder versus chronisch entzündeter Mukosa mittels Taqman® PCR .....	55
6.2 Expression von NALP2 und NALP3 in in vitro differenzierten Makrophagen von CED – Patienten.....	57
6.3 Proteinnachweis von NALP2 und NALP3 mittels Westernblot .....	58
6.4 Nachweis des NALP2/3 Proteins in Darmmukosa Immunhistochemie ..	60
<b>7. Ausblick .....</b>	<b>61</b>

<b>8. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>62</b>
<b>9. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>63</b>
<b>10. Literatur.....</b>	<b>66</b>
<b>11. Danksagung.....</b>	<b>74</b>
<b>12. Lebenslauf .....</b>	<b>75</b>

## **1. Einleitung**

Bis heute ist die Ätiologie und Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen noch nicht vollständig verstanden.

Mit der Entdeckung der Mutationen im NOD2 / CARD15 Gen im Jahr 2001, die das Risiko erhöhen, einen Morbus Crohn zu entwickeln, erkannte man, dass Darmwand-ständige Makrophagen als Abwehrzellen des angeborenen Immunsystems eine entscheidende Rolle in der Entstehung von chronischen Entzündungsprozessen im Darm spielen.

In der folgenden Arbeit aus dem Bereich Gastroenterologie der Inneren Medizin sollte der Einfluss der Inflammasomkomponenten NALP2 und NALP3 auf die Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen gezeigt werden. Dafür wurde die Expression der beiden Gene in Darmmakrophagen aus gesunder Mukosa verglichen mit der Expression in Darmmakrophagen aus entzündeter Mukosa.

### **1.1 Aufbau der Darmwand**

Kenntnisse über den Aufbau und die Aufgaben des Gastrointestinaltrakts sind wichtige Voraussetzung für das grundlegende Verständnis der pathophysiologischen Veränderungen bei der Entstehung Chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.

Die Hauptaufgabe des Verdauungskanal besteht darin, die aufgenommene Nahrung in resorbierbare Bestandteile zu überführen, die dann zur weiteren Verwertung absorbiert werden. Dazu dienen die mechanische Nahrungszerkleinerung in Mund und Magen und der enzymatische Aufschluss durch die Verdauungssäfte aus Magen, Pankreas und Galle. In Jejunum und Ileum findet der Hauptanteil der Wasserabsorption statt, bestehend aus Flüssigkeit durch Nahrungsaufnahme, Speichel, Magensaft, Galle, Pankreas- und Duodenalsaft. Die Mukosa des Gastrointestinaltrakts spielt also eine wichtige Rolle bei der Regelung des Wasser- und Elektrolythaushaltes.

Für diese unterschiedlichen Funktionen gliedert sich der Verdauungskanal in seine Abschnitte Oropharynx, Ösophagus, Magen, Dünn- und Dickdarm.

Trotz ihrer verschiedenen Aufgaben im Verdauungsvorgang besitzen alle Darmabschnitte einen prinzipiell gleichen Aufbau, der im Folgenden näher erläutert werden soll:

Die Darmwand besteht vom Lumen her gesehen aus vier Schichten, die oft kurz als Mukosa, Submukosa, Muskularis und Serosa bezeichnet werden.

Die Tunica mucosa, auch Schleimhaut genannt, besteht zum Darmlumen hin aus Epithel (Lamina epithelialis) und aus lockerem Bindegewebe (Lamina propria mucosae). Diese enthält neben Blut- und Lymphgefäßen auch zahlreiche freie Zellen für die Abwehr, wie Makrophagen, Mastzellen, Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen. Darunter befindet sich eine schmale Schicht glatter Muskulatur, die Lamina muscularis mucosae.

Sie grenzt morphologisch die Mukosa von der Submukosa ab. Das Epithel der Mukosa stellt die wichtigste Barriere zwischen Darmlumen und Körper dar. Es setzt sich aus vielen verschiedenen Zelltypen zusammen, deren Aufgabe es ist, Verdauungssäfte, Schleim und Hormone zu produzieren, bzw. Nahrungsstoffe und Wasser zu resorbieren.

Jeder Darmabschnitt weist einen für ihn spezifischen Epitheltyp auf. Unter der Tunica mucosa befindet sich als bindegewebige Verschiebeschicht die Tela submucosa. Sie enthält neben zahlreichen Blut- und Lymphgefäßen auch einen Teil des enterischen Nervensystems, den Plexus submucosus (Meißner) für die Steuerung der Funktion der Mukosa.

Es folgt die Tunica muscularis. Sie besteht aus zwei Schichten glatter Muskulatur, einer inneren Ring- und äußeren Längsmuskelschicht. Dazwischen liegt der zweite Teil des enterischen Nervensystems, der Plexus myentericus (Auerbach), der den Tonus und Rhythmus der Kontraktionen der Darmwand steuert. Die Tunica serosa stellt die äußerste umgebende Schicht der Darmwand dar und besteht aus der Lamina propria und der Lamina epithelialis [1].



Neben der Verdauungsarbeit hat der Darm noch eine weitere wichtige Funktion im Bereich des Immunsystems. Da mit der Nahrung auch viele Krankheitserreger aufgenommen werden, besitzt der Gastrointestinaltrakt ein eigenes Immunsystem, mit der weitaus größten Lymphozytenpopulation des Körpers.

Da die Mukosa die erste Barriere des Körpers zum Schutz vor der Invasion pathogener Keime und Antigene aus dem Darmlumen darstellt, befinden sich hier die Zellen des Immunsystems, Makrophagen, Dendritische Zellen und T-Zellen diffus verstreut, bzw. in den Lymphfollikeln oder deren Ansammlungen im Dünndarm, den so genannten Peyer-Plaques. Gleichzeitig dient die Barriere der Mukosa aber auch der Verhinderung einer überschießenden Immunantwort. Das Epithel der Mukosa enthält M-Zellen (microfold - Zellen), die zur Transzytose befähigt sind. Dadurch werden die aufgenommenen Antigene den Antigenpräsentierenden Zellen zugeführt. Diese wandern in die Lymphfollikel ein und die Lymphozyten differenzieren nach Antigenkontakt zu Plasmazellen. Anschließend wandern diese in die Lamina propria aus. Sie bilden dort dimere Antikörper der Immunglobulinklasse A (IgAs) die über das Epithel ins intestinale Lumen sezerniert werden. So wird ein weiteres Eindringen pathogener Keime über die Darmwand in den Körper verhindert.

Man geht heute davon aus, dass diese Immunmechanismen im Darm an der Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen beteiligt sind [1].

## **1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen**

Die wichtigsten Vertreter der Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Inflammatory Bowel Disease, IBD) sind Morbus Crohn (crohn's disease, CD) und Colitis ulcerosa (ulcerative colitis, UC). Bei beiden Erkrankungen handelt es sich um chronisch - rezidivierende, unspezifische Entzündungen des Darmtrakts [10].

Die erste Beschreibung der Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen geht zurück auf Giovanni Morgagni (1682-1771), der von einem jungen Patienten mit Abdominalschmerz und blutiger Diarrhoe berichtete; er nannte es granulomatöse Enterokolitis. 1859 prägte Wilkes den Begriff der „ulzerativen

Kolitis“. Heute bekannt unter dem Namen Morbus Crohn, beschrieb B. Crohn 1932 ein Kollektiv von 14 Patienten mit subakuter Entzündung des terminalen Ileums.

Die Symptome wurden zusammengefasst in dem Begriff „Ileitis terminalis“ und es wurde eine infektiöse Ursache vermutet [3].

Bis heute ist die Ätiologie dieser Erkrankungen nicht vollständig geklärt: Neben Umwelteinflüssen spielen auch genetische und immunologische Faktoren eine Rolle [2]. Beide Erkrankungen zeigen einige Gemeinsamkeiten:

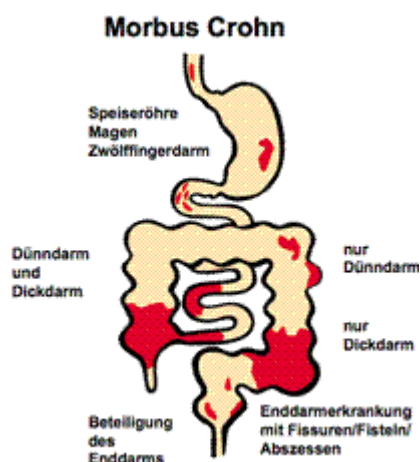
Die Erstmanifestation liegt zwischen dem 15ten und 35ten Lebensjahr. Die Prävalenz liegt für beide Erkrankungen zusammengekommen bei 100 – 200 / 100000 [2].

Im Folgenden sollen die speziellen Unterschiede der beiden Erkrankungen ausführlich dargestellt werden.

### 1.2.1 Morbus Crohn

Der Morbus Crohn ist charakterisiert als eine diskontinuierliche, segmentale Darmentzündung, die alle Wandschichten betreffen kann.

Das Befallsmuster kann sich über den gesamten Gastrointestinaltrakt verteilen, hauptsächlich sind allerdings, wie in Abbildung 1 ersichtlich, terminales Ileum und Kolon betroffen.

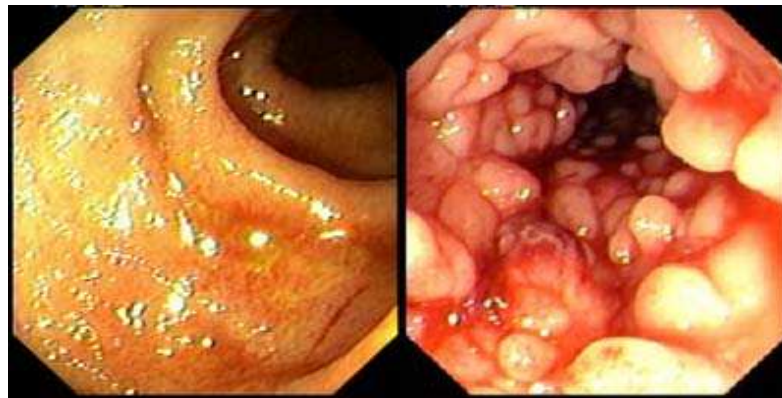


**Abb. 1: Befallsmuster Morbus Crohn**

Die Ausbreitung kann im Verlauf der Erkrankung sowohl zu- als auch abnehmen, dabei wechseln sich gesunde mit erkrankten Darmabschnitten ab (Skip Läsionen). Klinisch zeigen sich krampfartige Bauchschmerzen, Fieber, Gewichtsverlust und Blutungen. Als Komplikation können Fisteln, Stenosen und Strikturen auftreten, die häufig ein operatives Eingreifen erfordern, welches allerdings Rezidivgefahr und Prognose nicht verbessert [2].

Bei Morbus Crohn - Patienten zeigen sich häufig auch extraintestinale Symptome wie Erythema nodosum, Pyoderma gangränosum, Uveitis, Iritis und entzündliche Gelenkserkrankungen.

Endoskopische Charakteristika des Morbus Crohn sind der diskontinuierliche Befall, Rötungen und das Pflastersteinrelief der Schleimhaut aufgrund „fissuraler Ulzerationen“ [4].

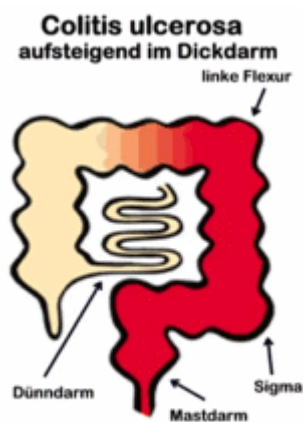


**Abb. 2: Koloskopiebefund gesunder Darm (links), MC - Darm (rechts)**

Histologisch dominiert das transmurale Entzündungsinfiltrat und die entzündlich - degenerativen Veränderungen von Gefäßen und Nerven. Dabei kann die Kryptenarchitektur im Gegensatz zur Colitis ulcerosa noch vollständig erhalten sein. Im Epithelverband findet man neben Granulozyteninfiltraten und Kryptenabszessen auch epitheloidzellige Granulome. Die Muscularis propria ist verdickt und fibrosiert [4].

### 1.2.2 Colitis ulcerosa

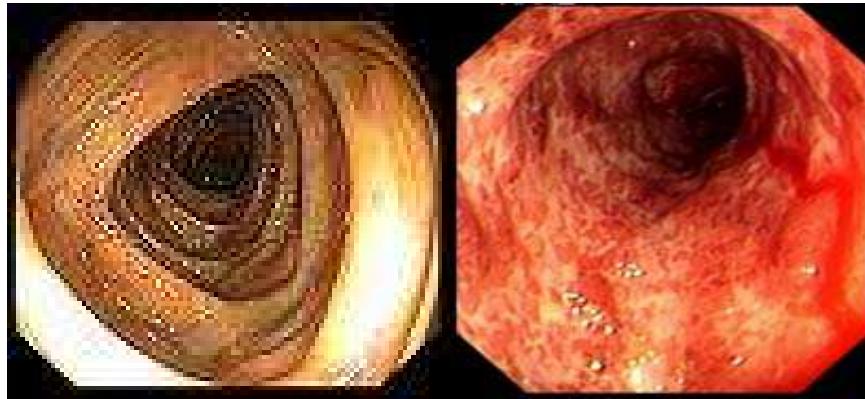
Im Gegensatz zum Morbus Crohn beginnt die Colitis ulcerosa fast immer im Rektum (> 95%) und breitet sich kontinuierlich nach kranial aus. Im Rahmen einer Pankoloitis kann sich das gesamte Kolon und im Sinne einer „backwash Ileitis“ sogar das terminale Ileum entzünden. In Abbildung 3 wird die Ausbreitung der Erkrankung noch einmal ersichtlich:



**Abb. 3: Ausbreitungsmuster Colitis Ulcerosa**

Als Symptome gehen mit der Colitis ulcerosa Abdominalschmerzen, blutig - schleimige Diarrhoe, Fieber und Gewichtsverlust einher. Dabei kann es zu massiven perianalen Blutungen, einem toxischen Megakolon, einer Kolonperforation oder einer Kolonstriktur kommen. In Assoziation zu Colitis ulcerosa steht ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Kolorektalkarzinoms [2].

Endoskopische Charakteristika der Erkrankung sind eine aufgelockerte, hyperämische und vulnerable Schleimhaut. Es kommt also häufig zu Kontaktblutungen. Im Verlauf der Erkrankung verliert sich das Schleimhautrelief. Es entwickeln sich Erosionen und Ulzerationen, die schließlich zu pseudopolypösen Schleimhautauffaltungen führen können.



**Abb. 4: Koloskopiebefund normaler Darm (links) / UC - Darm (rechts)**

Histologisch zeichnet sich die Colitis ulcerosa durch eine rein mukosale Entzündung mit einem Infiltrat aus Lymphozyten, Plasmazellen, Neutrophilen Granulozyten und Mastzellen in Mukosa und Submukosa aus. Diese Zellinfiltrate führen zu Kryptenabszessen. Auch zwischen den typischen Schleimhautulzerationen findet sich eine gestörte Kryptenarchitektur. Die Schleimhaut zeigt einen hämorrhagischen Charakter aufgrund weit gestellter Blutgefäße [4].

### **1.2.3 Ursachen der Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Seit der Entdeckung der Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurden viele Theorien zur Ätiopathogenese diskutiert, aber häufig auch wieder verworfen. Ein definitiver Auslöser konnte bis heute jedoch noch nicht identifiziert werden. Vielmehr geht man von einer multifaktoriellen Genese aus: Neben einer genetischen Suszeptibilität spielen auch Umwelteinflüsse, mikrobielle Faktoren und die Immunreaktion im Darm eine Rolle.

Als Risikofaktoren für die Entstehung von Chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, bzw. zu einer Verschlechterung des Krankheitsverlaufs tragen die Einnahme oraler Kontrazeptiva, Antibiotika oder Nichtsteroidaler Antirheumatika bei. Das Zigarettenrauchen wird kontrovers diskutiert. Während

es bei Morbus Crohn zu einer Verschlechterung des Verlaufs führt, gilt es bei der Colitis ulcerosa als protektiver Faktor [5, 6, 7].

Wegen des ausgeprägten Nord-Süd - Gefälles der Erkrankung einerseits und dem kontinuierlichen Anstieg der Prävalenz in allen geographischen Bereichen andererseits, scheint der „westliche Lebensstil“ mit immer höheren Ansprüchen an Hygiene und Ernährung als Auslösefaktor für die Entstehung Chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eine große Rolle zu spielen [5, 8]. Außerdem werden Einflüsse von Mikroorganismen auf die Ätiologie der Erkrankungen diskutiert. So erhöht sich das Risiko für die Entwicklung einer Chronisch entzündlichen Darmerkrankung nach stattgehabter Maserninfektion [8, 9]. Auch eine Infektion mit Mycobakterium paratuberculosis ist bei den an Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Erkrankten häufiger zu finden als in der Normalbevölkerung [8, 10]. Neben einer Besiedelung mit pathogenen Keimen, wie adhärent - invasiver E.coli-Stämmen, zeigen die Patienten auch häufig eine vermehrte Besiedelung mit apathogenen Keimen, also den Kommensalen [10]. Durch eine gestörte Barrierefunktion können diese Antigene aus dem Darmlumen die Mukosa passieren und das Immunsystem aktivieren. Es kommt zur „loss of tolerance“ gegenüber der normalen Darmflora [8, 10].

Neben den genannten Umwelteinflüssen lag in den letzten Jahren ein besonderes Augenmerk auf molekulargenetischen Pathomechanismen:

Da bis zu 10% der Erkrankten eine positive Familienanamnese berichten und die Konkordanz für monozygote Zwillinge bei 58%, die für dizygote nur bei 4% liegt, müssen genetische Faktoren an der Ätiologie beteiligt sein. Als erstes „Suszeptibilitätsgen“ für die Entwicklung eines Morbus Crohn, nicht aber einer Colitis ulcerosa, wurde vor circa 10 Jahren eine perizentromere Mutation im Chromosom 16 entdeckt. Durch eine Frameshift-Mutation, z.B. durch Insertion eines Cytosins, kommt es zur Veränderung des Genprodukts, dem NOD2. Diese wird hauptsächlich in den Zellen des angeborenen Immunsystems, vor allem den Monozyten und Makrophagen exprimiert. Bei Defekten in diesem Rezeptor zur Erkennung bakterieller Motive, wie dem MDP (muramyl dipeptide), kommt es zu einer überschießenden Immunreaktion durch vermehrte Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors *nuclear factor*

*kappa B* (NF $\kappa$ B) [14]. Im NOD2 - Gen sind noch zwei weitere Mutationen bekannt.

Bis zu 15% der Morbus Crohn - Patienten tragen eine dieser Mutationen, weitere 15 - 20% tragen zwei der genannten Mutationen.

Insgesamt kennt man noch mindestens 15 weitere Suszeptibilitäts - Loci, unter anderem in den Genen für den Vitamin D - Rezeptor oder den HLA-Molekülen [11, 12].

Zusätzlich konnten bei Patienten mit Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen noch weitere Fehlregulationen des Immunsystems entdeckt werden. Durch Überexpression der Toll - like Rezeptoren (TLR) 2 und 4 in Makrophagen und vermehrter Aktivierung von T-Helfer - Zellen kommt es zu einer überschüssigen Bildung proinflammatorischer Zytokine, wie dem Interleukin (IL) 1, 12 und 18 [10, 13]. Die Fehlregulation der intestinalen Makrophagen wird im Folgenden Teil dieser Arbeit noch näher erläutert.

Schon dieser kurze Überblick zeigt, dass viele Ansätze existieren, um die Ätiologie der Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu klären. Ein einzelner Faktor als auslösendes Moment konnte jedoch noch nicht identifiziert werden. Die heutige Theorie geht von einem multifaktoriellem Geschehen aus, das noch weiterer „Erforschung“ bedarf.

### **1.3 Das angeborene Immunsystem**

Das angeborene Immunsystem stellt die früheste Antwort eines Organismus auf eingedrungene Pathogene dar. Seine Hauptkomponente, die phagozytierenden Zellen, wie Makrophagen und Neutrophile Granulozyten erkennen Mikroorganismen anhand ihrer Oberflächenmarker. Um eine möglichst große Vielfalt von Antigenen zu erkennen, besitzen sie ein mannigfaltiges Repertoire an Rezeptoren, die von rekombinanten Genen kodiert sind. Gleichzeitig muss das angeborene Immunsystem aber auch die Fähigkeit besitzen, zwischen „selbst“ und „nicht selbst“ zu unterscheiden [1].

### 1.3.1 Entstehung und Aufgabe der Makrophagen

Makrophagen reifen kontinuierlich aus den im Blut zirkulierenden Monozyten heran, die die Zirkulation in der Blutbahn verlassen und ins Gewebe auswandern. Dort können sie je nach funktioneller Belastung bis zu mehrere Monate überleben. Die Makrophagen des gesamten Organismus werden als mononukleäres Phagozytensystem (MPS) des Körpers bezeichnet [1]. Mit Hilfe ihrer Oberflächenrezeptoren, den *pattern recognition receptors* (PRR) erkennen sie Schlüsselmoleküle auf der Oberfläche von Pathogenen, so genannte *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs), wie z.B. das Lipopolysacharid (LPS), Peptidoglycan, Lipoteichonsäure, Mannane oder Glycane. Zu den wichtigsten PRRs gehört der Mannose-Rezeptor für die Erkennung Mannose-reicher Kohlenhydrate und die Scavenger-Rezeptoren, wie CD 36 und 91, für die Bindung geladener Liganden. Die Bindung an genannte Rezeptoren resultiert in der Aktivierung des Makrophagen und damit der Phagozytose. Das Antigen wird in einem Vesikel aufgenommen (Phagosom) und mittels Enzyme, wie Cathepsinen oder reaktiven Sauerstoffmetabolite, aus dem Lysosom abgebaut (Phagolysosom). Die Phagozytose kann durch vorherige Opsonierung des Pathogens mit Immunglobulin oder dem Komplementfaktor C3b erleichtert werden.

Eingedrungene Keime können aber nicht nur durch Phagozytose vernichtet werden, sondern auch mittels der sogenannten Zytotoxizität der Makrophagen lysiert werden. Dazu binden Makrophagen mit ihrem Immunglobulin-Rezeptor (Fc - Rezeptor) an die mit Immunglobulin markierten Zielzellen.

Durch Freisetzung zytotoxischer Substanzen, wie *Tumor Nekrose Faktor* (TNF), wird die Zielzelle lysiert. Mittels der Zytokinsekretion können Makrophagen die Immunantwort modulieren, indem sie andere Komponenten des Immunsystems rekrutieren. Aktivierte Makrophagen sezernieren Botenstoffe wie TNF, Chemokine wie MCP-1, verschiedene Interleukine (IL 1, 6, 8, 12, 18), Enzyme wie Lysozym und Komplementfaktoren (C1 bis C5).

Die freigesetzten Zytokine führen zur Chemotaxis weiterer Phagozyten und leisten einen wichtigen Beitrag zur lokalen Immunreaktion [15].



### 1.3.2 Differenzierung intestinaler Makrophagen

Die Makrophagen des Gastrointestinaltrakts stellen das größte Kompartement des mononukleären Phagozytensystems des Organismus dar. Sie spielen eine zentrale Rolle in der Abwehr von Antigenen aus dem Darmlumen. Etwa 10 - 20% der mononukleären Zellen des Darmes sind Makrophagen. Sie liegen strategisch günstig positioniert in der Lamina propria, also in direkter Nähe zu einer Vielzahl luminaler Bakterien und Antigenstimuli [16, 17, 18].

Intestinale Makrophagen (IMACS) differenzieren aus den im Blut zirkulierenden Monozyten. Die Endothelzellen der Blutgefäße in der Mukosa exprimieren Moleküle für die Adhärenz und die transendotheliale Migration ins Gewebe der Mukosa.

Da diese gewebsständigen Makrophagen nicht proliferieren können bedarf es eines ständigen Nachschubs an Monozyten, welche mittels dem Chemoattractant *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) rekrutiert werden [16].

Zur Prävention chronischer und permanenter Entzündung im Darm als Reaktion des Immunsystems auf die kommensale Flora und die Vielzahl an Antigenen aus der Nahrungsaufnahme, zeigen die IMACS einen relativ inerten, sehr speziellen Phänotyp:

Die typischen Monozyten-Oberflächenmarker, wie der LPS-Rezeptor CD14 oder der Fc $\gamma$ III - Rezeptor CD16 werden nur noch von etwa 5 - 10% der Makrophagen exprimiert. Auch der Rezeptor für den Komplementfaktor C3b (CD11b) und die für die Induktion der T-Zellen wichtigen T-Zell co-stimulierenden Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) sind deutlich herabreguliert [17]. Desweiteren fehlt den intestinalen Makrophagen die Expression der *toll - like receptors* (TLR) 3 und 4 zur Erkennung bakterieller Zellwandbestandteile [18].

Somit produzieren diese Zellen auch weniger *Interleukin-1 $\beta$*  (IL 1 $\beta$ ), ein Zytokin und Entzündungsmediator, der hauptsächlich von den mononukleären Phagozyten produziert wird [17]. In der nichtentzündeten Darmmukosa konnte auch keine Aktivität des proinflammatorischen Transkriptionsfaktor *Nuclear factor -  $\kappa$ B* (NF $\kappa$ B) nachgewiesen werden.

Ein weiterer Verlust der immunologischen Aktivität zeigt sich im Mangel antibakterieller Toxizität und dem Verlust der Enzyme für die *Oxidative burst* - *reaction*, wie der NADPH - Oxidase [18]. Als Antwort auf die Phagozytose werden keine Zytokine wie IL1 oder IL6 gebildet und IMACS scheinen auch nicht zur Chemotaxis befähigt zu sein.

Trotz dieses Aktivitätsverlustes sind intestinale Makrophagen aber hoch effektiv im Abtöten phagozytierter Mikroorganismen. In Versuchen konnte gezeigt werden, dass Makrophagen im Vergleich zu Monozyten eine sehr viel höhere Potenz besitzen, die typischen Darmpathogene wie *E. coli* oder *Salmonella typhimurium* abzutöten [16]. Während der Differenzierung zum IMAC kommt es zu einer Induktion der Expression des Rezeptors *Macrophage inflammatory protein-3α* ((MIP-3α), der eine wichtige Rolle für die Rekrutierung der T - Zellen der Mukosa spielt [18]. Eine Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen ist auch *in vitro*, durch Kultivierung der Zellen über 7 Tage in humanem Serum, möglich. Diese *in vitro* - *differenzierten* Makrophagen zeigen allerdings einen vom IMAC unterschiedlichen Phänotyp: Sie exprimieren wie die Monozyten den LPS-Rezeptor CD14 und zeigen sogar eine noch stärkere Expression von CD16 [19]. Eine *in vitro* Differenzierung in einen dem intestinalen Makrophagen möglichst ähnlichen Phänotyp, ist bisher nur im so genannten Sphäroid - Modell gelungen [17].

All diese genannten Eigenschaften der intestinalen Makrophagen tragen dazu bei, eine Immunreaktion auf die lebensnotwendige kommensale Darmflora zu verhindern. Bei Makrophagen von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen kommt es zu einer Fehlregulation der Differenzierung und die Zellen zeigen ein erhöhtes Aktivitätsniveau.

### 1.3.3 Intestinale Makrophagen bei Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

IMACS von Patienten mit Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zeigen einen von den normalen Darmmakrophagen abweichenden, aggressiveren Phänotyp. Insgesamt ist auch die Anzahl dieser Zellen im entzündeten Gewebe vermehrt [20]. Es konnte eine Population von Makrophagen mit deutlich höherer LPS-Rezeptor Expression nachgewiesen werden. In entzündeten Darmabschnitten sind bis zu 40% der Makrophagen CD14-positiv [21, 22]. Neben CD11b, CD16 und HLA-DR sind auch die T-Zell costimulatorischen Moleküle B7-1 und B7-2 vermehrt exprimiert [22, 23]. Desweiteren zeigt sich während der Entzündung eine Aktivierung von NFκB. Das Cathepsin D, eine Peptidase des Lysosoms, wird vermehrt gebildet und es ist eine gesteigerte NADPH-Aktivität nachzuweisen. Die *Oxidative burst - reaction* ist also nicht herabreguliert, wie bei normalen IMACS [24, 25, 26].

Proinflammatorische Zytokine wie IL1α, IL1β, IL6 und IL8 werden genauso wie TNF und TGFβ vermehrt gebildet, was die Entzündungsreaktion noch weiter vorantreibt [21]. Mit der gesteigerten Sezernierung des *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) durch IMACS von Patienten mit Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, wandern vermehrt Monozyten ins Gewebe ein, gleichzeitig wird aber deren Differenzierung zum intestinalen Makrophagen, also dem inaktiven Typ, verhindert [27, 28].

Somit existiert in der Mukosa von Patienten mit Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine heterogene Population an Makrophagen, von denen einige einen erhöhten Aktivierungszustand aufweisen.

## 1.4 Die Erkennung mikrobieller Motive durch das angeborene Immunsystem

Die phagozytierenden Zellen des Immunsystems exprimieren so genannte *pattern recognition receptors* (PRRs) zur Erkennung pathogener Motive, den *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), wie Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglycan (PGN) oder auch virale Produkte. Der wohl bekannteste PRR ist der transmembran-ständige Toll - like receptor (TLR).

Dieser erkennt und bindet extrazelluläre PAMPs, was zu einer Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden führt:

Es werden antimikrobielle Effektormoleküle freigesetzt, das erworbene Immunsystem wird aktiviert und Cytokine wie IL1 $\beta$  und *tumor necrosis factor* (TNF) werden ausgeschüttet. Neben den Membranständigen TLRs existieren auch lösliche Rezeptoren, wie Pentaxin, oder cytosolische Rezeptoren, die *Nod - like receptors* (NLRs). Zu letzteren zählen neben den bekannten NODs die Familie der NALPs, auf die im Folgenden Teil der Arbeit näher eingegangen werden soll [29, 30, 31].

### 1.4.1 Struktur und Funktion der NALPs

Im Jahr 2003 wurde von Tschopp et al. eine neue Subfamilie der intrazellulären PAMPs entdeckt, die NALPs. NALP steht als Abkürzung für NACHT, LRR, PYD, also dem strukturellen Aufbau dieser Proteine:

Am C-Terminal befinden sich 20 - 29 Reste der Aminosäure Leucin, die *leucin - rich repeats* (LRR). Sie dienen der Erkennung mikrobieller Motive. Das zentral gelegene *nucleotide-binding site* (NBS) - Molekül NACHT sorgt für die Oligomerisation des Proteins und reguliert über die Bindung von ATP dessen Aktivität. Am N-Terminus befindet sich die Domäne für die Protein-Protein-Interaktion. Es handelt sich hierbei entweder um ein CARD (*caspase activating and recruitment domain*) oder ein PYD (*pyrin domain*) [32].

Bisher sind 14 verschiedenen NALPs bekannt, die sich in ihrem Aufbau alle sehr ähnlich sind. Da NALP 3, der bekannteste Vertreter dieser Proteinfamilie ist, soll es in der folgenden Abbildung exemplarisch den Aufbau der NALPs demonstrieren.



**Abb. 5: NALP3 - Molekül**

NALP2 - 14 gehören zu den short NALPs. NALP1 hingegen besitzt eine zusätzliche CARD - Domäne. NALP1 kann via Caspase 2 und 9 die Apoptose induzieren, es scheint aber auch eine wichtige Rolle in der Aktivierung der proinflammatorischen Zytokine zu spielen. [30]

Über NALP 4 - 14 ist bisher noch nicht viel bekannt. NALP 1, 2, 3, 6 und 12 sind befähigt zur Bildung eines Inflammasoms, das im Weiteren noch näher erklärt wird.

Die beiden bekanntesten NALPs, die auch in dieser Arbeit näher untersucht wurden, NALP 2 und NALP 3 (Cryopyrin), können beide über die Bildung des Inflammasoms die Caspase - 1 induzieren und die Aktivität von NFκB regulieren [33]. Sie werden hauptsächlich in den phagozytierenden Zellen des Immunsystems gebildet.

Mutationen im Gen für NALP3 liegen meist in der NACHT - Region und führen zu chronisch entzündlichen Erkrankungen oder erblichen Fiebersyndromen. Diese sind charakterisiert durch rezidivierende Fieberschübe, eine entzündliche Allgemeinreaktion und entzündliche Gelenks- oder Hautveränderungen. Zu ihren bekanntesten Vertretern zählen das Familiäre Mittelmeerfieber und das Muckle-Wells – Syndrom. Die NALP3 Genexpression wird reguliert durch TNF [30,32]. Als Mitglieder der NBS-LRR - Proteine (Nucleotide-Binding Site, Leucin-Rich repeats) ist die Hauptaufgabe von NALP2 und 3 die Erkennung intrazellulärer Pathogene. Darauf reagieren sie mit der Ausbildung des sogenannten Inflammasoms, welches im Folgenden näher erläutert werden soll.

### 1.4.2 Aufbau und Funktion des Inflammasoms

Bei Inflammasom handelt es sich um einen 700 kDa Multiproteinkomplex [34,35]. Es entsteht intrazytoplasmatisch aus der Zusammenlagerung eines NALP2 oder 3 mit je einem Adaptermolekül ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) und Cardinal, an die je eine pro-Caspase - 1 bindet. Durch die räumliche Annäherung der beiden pro-Caspase - Moleküle werden diese aktiviert und können nun in ihrer Funktion als *Interleukin 1 converting enzyme* (ICE) pro-IL-1 $\beta$  in IL-1 $\beta$  spalten.

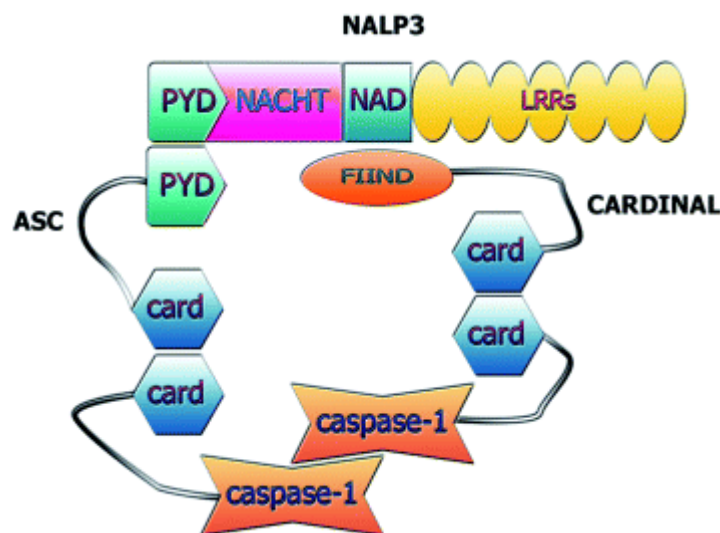


Abb. 6: Aufbau des Inflammasoms

IL-1 $\beta$  ist ein hochpotentes proinflammatorisches Zytokin und Schlüsselmediator in der systemischen und lokalen Entzündungsreaktion. Es ist das wichtigste endogene Pyrogen und bewirkt neben einer Leukozytose, Thrombozytose, arterieller Hypotonie auch die Steigerung der Produktion der Akut Phase Proteine C-reaktives Protein (CRP) und Serum Amyloid A (SAA) in der Leber. Eine große Rolle spielt dieses Zytokin auch im Rahmen einer Sepsis. Beim gesunden Menschen kann keine aktive Form von IL-1 $\beta$  nachgewiesen werden, bei Morbus Crohn - Patienten dagegen konnte man im Serum erhöhte IL-1 $\beta$ -Werte nachweisen. Im Jahr 1998 beschrieb Bode eine gesteigerte Sekretion im

Gastrointestinaltrakt als Reaktion auf IL-1 $\beta$ . Da dieses Zytokin also ein potenziell gefährlicher Entzündungsmediator ist, muss seine Prozessierung und Freisetzung streng kontrolliert stattfinden, man benötigt dafür mindestens zwei voneinander unabhängige Stimuli:

Über TLR - Liganden wie LPS kommt es nach NF $\kappa$ B - Aktivierung zur intrazellulären Anreicherung von proIL-1 $\beta$ . Dieses wird in einem weiteren Schritt von der im Inflammasom aktivierten Caspase-1 in seine aktive Form IL-1 $\beta$  gespalten:

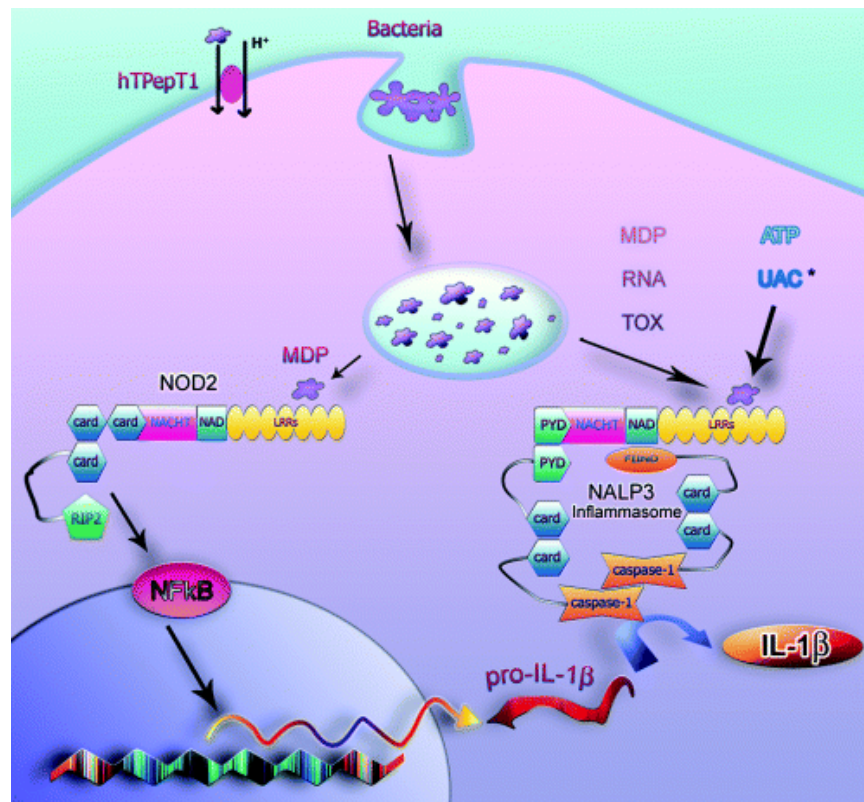


Abb. 7: Aktivierung des Inflammasoms und Bildung von IL1- $\beta$

### 1.4.3 Aktivatoren des Inflammasoms

Bekanntester Ligand für NALP3 ist das Muramyl Dipeptid (MDP), ein Spaltprodukt von Peptidoglycan (PGN). Es ist Wandbestandteil gram - positiver als auch gram - negativer Bakterien. LPS dagegen kann NALP3 nicht aktivieren, sondern lediglich über den TLR zur Produktion von pro IL-1 $\beta$  führen (40, 41, 42). Nach Ferrero - Milani aktiviert das MDP über NOD2 NF $\kappa$ B und es kommt ebenfalls zur Bildung der inaktiven Vorstufe von IL-1 $\beta$ , welches dann vom aktivierten Inflammasom gespalten werden kann (31, 42).

Bakterielle RNA oder Imidazoquinolin sind weitere bakterielle Motive die zur Ausbildung des Inflammasoms führen. Neben einigen weiteren Bakterien aktivieren vor allem *Staphylococcus aureus* und *Listeria monocytogenes* NALP3. Die Aktivität des Inflammasoms wird auch durch so genannte DAMPs (danger-associated molecular patterns). Dazu gehört vor allem das ATP, welches einen Kaliumausstrom bewirkt. Tschopp konnte Kristallstrukturen wie das MSU (Monosodiumurat) oder das CPPD (Calciumpyrophosphat-Dihydrat) als Liganden für NALP3 identifizieren. Auch sie gehören zu den DAMPs und werden wie zum Beispiel MSU bei UV - Schäden der Haut gebildet (44, 45). Eine Zusammenfassung der Vielzahl an Liganden für das Inflammasom liefert Abbildung 8:

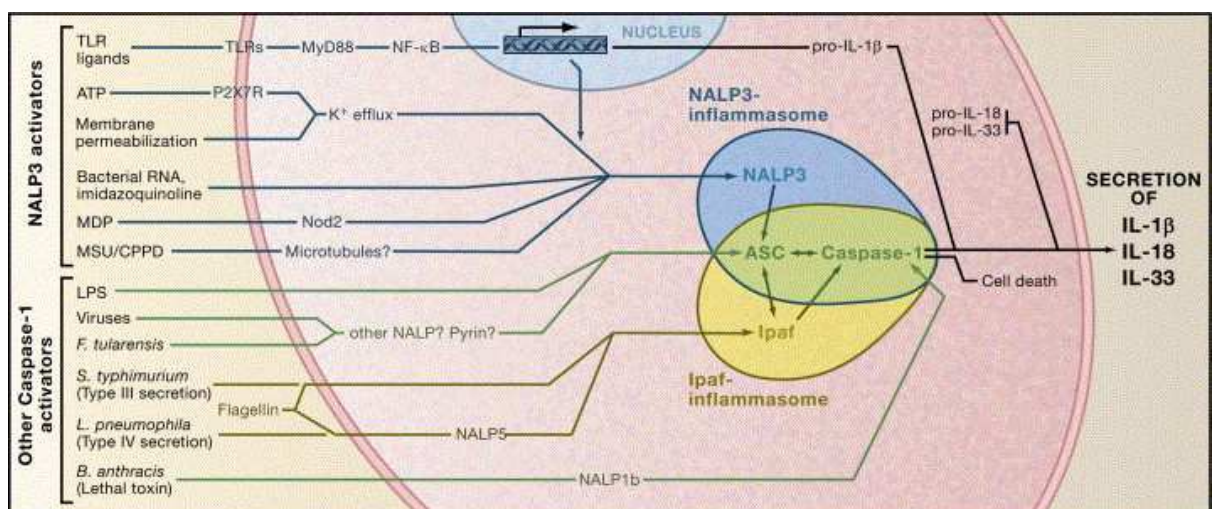


Abb. 8: Liganden des NALP3 – Inflammasoms



Dieses Modell verdeutlicht, dass ein rein extrazelluläres Signal, zum Beispiel durch die kommensale Darmflora nicht ausreicht, um das Immunsystem zu aktivieren [31, 36, 37, 38].

Als weiteres proinflammatorisches Zytokin induziert das Inflammasom die Bildung von IL 18. Diese kann direkt die Expression von TNF induzieren. Es wirkt als co-stimulatorischer Faktor für die Proliferation der Th-1 Zellen und deren Produktion von IF $\gamma$ . Außerdem fördert es die Aktivität der NK-Zellen und die Ausschüttung weiterer inflammatorischer Zytokine [33, 39].

## 2. Ziel der Arbeit

Wie schon in der Einleitung erwähnt, findet man bei Patienten, die an einer Chronisch entzündlichen Darmerkrankung leiden, eine überschießende Antwort des Immunsystems. Inwieweit außer dem schon bekannten NOD2 auch noch andere *pattern recognition receptors* an der Pathogenese dieser Erkrankungen beteiligt sind, muss erst noch geklärt werden.

In ihrer Funktion als „Detektor“ pathogener Motive scheinen hier auch die Inflammasomkomponenten NALP2 und NALP3 eine Rolle zu spielen.

In dieser Arbeit soll die Expression von NALP2 und NALP3 in intestinalen Makrophagen aus gesunder Mukosa mit Makrophagen aus der Mukosa von CED - Patienten verglichen werden.

Da sich die intestinalen Makrophagen aus den im Blut zirkulierenden Monozyten differenzieren, gilt die NALP2 und NALP3 - Expression in normalen Blutmonozyten als Referenzwert. Auch hier soll ein Vergleich „gesunder“ versus „kranker“ Zellen aufgestellt werden. Um dem Modell der in - vitro differenzierten Makrophagen näher zu kommen, soll auch in diesen NALP2 und NALP3 quantitativ mittels *Taqman*® PCR nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der Immunhistochemie und des Westernblots sollen Expressionsunterschiede auch auf Proteinebene verifiziert werden.

### 3. Material

#### 3.1 Verbrauchsmaterial

Deckgläser 24x60mm	Roth, Karlsruhe
ECL <sup>TM</sup> Hyperfilm	Amersham, Buckinghamshire, UK
Einmalpipetten 5, 10ml	Eppendorf, Hamburg
Eppendorcups 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
Objektträger Superfrost®Plus	Menzel Gläser, Braunschweig
Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems, Foster City, USA
PCR Tubes 0,5ml	Biozym, Oldendorf
Polystyrenröhrchen 15, 50ml	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Teflonbeutel Biofolie 25	Heraeus Sepatech, Hanau

#### 3.2 Geräte

ABI Prism 7900HAT, Sequenze Detection System	Applied Biosystems, Forster City, USA
Analysenwaage Sartorius analytic A120S	Sartorius, Göttingen
Biofuge fresco	Heraeus Sepatech, Hanau
Brutschrank Heraeus 6000	Heraeus Sepatech, Hanau
Durchlichtmikroskop	Leitz, Wetzlar
LS-Separationssäule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Megafuge 1,0R	Heraeus Sepatech, Hanau
Millipore Wasserfiltrationsanlage	Millipore, Eschhorn
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
Novex Mini-Cell	Invitrogen, Carlsbad, USA
Präparationsbesteck	Aesculap, Heidelberg
Röntgenfilmentwickler, Crurix 60	Agfa, Morstel, Belgien
Sterilbank LaminAir HB 2428	Heraeus Sepatech, Hanau
SuperMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortex	Heidolph, Kehlheim
Wasserbad, Liquitherm FV	Labora, Mannheim

### 3.3 Material für die Isolation von Blutmonozyten und Darmmakrophagen

β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Collagenase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Complete mini	Roche, Mannheim
Desoxicholsäure	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dnase	Roche, Mannheim
Ethylendiamin-Tetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lymphozytentrennmedium LSM 1077	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco, Eggenstein
Phosphatgepufferte Salzlösung PBS ohne Calcium und Magnesium	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
RPMI-1640 Medium	Biochrom, Berlin
Tris	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Biochrom, Berlin

### 3.4 RNA -Isolation und cDNA-Gewinnung

Rneasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Rnase-Free Dnase Set	Qiagen, Hilden
Reverse Transcription System	Promega, Mannheim

### 3.5 Bestimmung des Proteingehalts

Bicinchoninic Acid solution	Sigma Aldrich, Steinheim
CopperII Sulfate solution	Sigma Aldrich, Steinheim
Triton-X	Sigma Aldrich, Steinheim

### 3.6 Taqman® PCR

Taqman® Universal Mastermix	Applied Biosystems, Forster City, USA
Taqman® GAPDH Control Reagents (human)	Applied Biosystems, Forster City, USA
Primer-und SONDENSEQUENZEN	MWG-Biotech AG, Ebersberg

	Primersequenzen	Amplikonlänge
<b>Nalp2 for</b>	5'-GCG GAG GAG CCG ATC TAC AT-3'	103 bp
<b>Nalp2 rev</b>	5'-AGG CAC GCA TGG CTT GGT-3'	
<b>Nalp3 for</b>	5'-TGC CCC GAC CCA AAC C-3'	70 bp
<b>Nalp3 rev</b>	5'-CGT CCA TGA GGA AGA GGA TTC T-3'	

	SONDENSEQUENZEN
<b>Nalp2</b>	5'-AGG ACA GGA GGG CCT ATT-3'
<b>Nalp3</b>	5'-ACC CAT CCA CAA GAT CGT GAG AAA ACC C-3'

### 3.7 Immunhistochemie

Bovine Serum Albumine (BSA)	Biomol, Hamburg
ChemMate, Target Retrieval Solution 10x	DakoCytamation, Glostrup, Dänemark
Faramount Aqueous Mounting Medium	DakoCytamation, Glostrup, Dänemark
Vectorstain ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingham, USA
Vector® NovaRED Substrate Kit	Vector Laboratories, Burlingham, USA

### 3.8 Westernblot

ECL-Plus™ Westernblotting Detection Kit	Amersham, Buckinghamshire, UK
NitrocelluloseMembrane Filter Paper	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPage®Antioxidant	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPage®MOPS SDS Running Buffer 20x	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPage®Novex Bis-Tris 4-12%Gel	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPage®Sample Reducing Agent 10x	Invitrogen, Carlsbad, USA
Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope™	BIO-RAD Laboratories, München
Seebblue®Plus2Standard	Invitrogen, Carlsbad, USA
Transfer Buffer 20x	Invitrogen, Carlsbad, USA
Tween20	Sigma Aldrich, Steinheim

### 3.9 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in folgender Tabelle unter Angabe des Konjugats, des Spenderorganismus und des Herstellers zusammengefasst :

Antikörper	Konjugat	Spenderorganismus	Hersteller
Anti-CD33 MicroBeads	ohne	Maus IgG1 monoklonal	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Anti-CD14 MicroBeads	ohne	Maus IgG2a monoklonal	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Anti-Nalp2 IgG, polyklonal	ohne	Hase	Biozol, Echingen
Anti-Nalp3-b IgG1, monoklonal	ohne	Maus	Alexis, Lörrach
goat anti-mouse IgG	HRP	keine Angabe	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
goat anti-rabbit IgG	HRP	keine Angabe	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Maus IgG	Biotin	keine Angabe	Sigma Aldrich, Steinheim
Anti-rabbit IgG	Biotin	Schwein	Sigma Aldrich, Steinheim
Mouse IgG1 Isotype	ohne	Maus	Sigma Aldrich, Steinheim
Rabbit IgG	ohne	Hase	Dako Diagnostica GmbH, Hamburg

### 3.10 Puffer

<b>PBS 10x</b>	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O, pH 7,2	80 g 2 g 21,6 g 2 g ad 1 L
<b>MACS</b>	EDTA 0,5 M, pH 8,0 BSA PBS	0,5 ml 0,25 m ad 50 ml
<b>RIPA 2x</b>	Tris, 1M NaCl 5M Desoxicholsäure Triton X-100 SDS 10% Complete mini	5 ml 3 ml 1 g 1 ml 500 µl 1 Tablette
<b>Transfer Puffer</b>	NuPage® Transfer Buffer 20x NuPage® Antioxidant Methanol H <sub>2</sub> O	50 ml 1 ml 100 ml ad 1 L
<b>Wasch Puffer</b>	Tris 0,5 M, pH 6,8 NaCl 5M Tween 20 H <sub>2</sub> O	20 ml 20 ml 1 ml ad 1 L

### 3.11 Daten der verwendeten Makrophagen

Nummer	Erkrankung	Geburtsdatum
1	Rektum Karzinom	1951
2	Sigmadivertikulitis	1929
3	Sigmadivertikulitis	1965
4	Transversum Karzinom	1934
5	Sigmadivertikulitis	1939
6	Sigmadivertikulitis	1953
7	Sigmadivertikulitis	1941
8	Denervierung	1962
9	Sigmadivertikulitis	1964
20	Rektum Karzinom, RCT	1964
21	Sigmadivertikulitis	1937
22	Sigmadivertikulitis	1931
23	Rektum Karzinom, RCT	1924
24	Sigmadivertikulitis	1939
25	Sigmadivertikulitis	1935
26	Sigmadivertikulitis	1940
27	Rektum Karzinom	1960
28	Kolon Karzinom	1938
29	Sigmadivertikulitis	1933
30	Rektum Karzinom	1959
31	Sigmadivertikulitis	1956
32	M.C., Fistel	1965
33	M.C.	1980
34	M.C.	1959
35	M.C., Abszess	1959
36	M.C.	1967
37	M.C.	1988
38	C.U.	1968
39	C.U.	1941
40	C.U., Adenokarzinom	1972
41	C.U.	1964
42	C.U.	1952



## 4. Methoden

### 4.1 Isolation primärer Blutmonozyten

Die Isolation der Monozyten erfolgt aus 15 ml Vollblut im Lithium-Heparin - Röhrchen. Das Blut wird mit weiteren 15 ml RPMI-Medium gemischt, je 15 ml des Gemisches werden im 50ml - Falcon über 15 ml Lymphozytenseparationsmedium (LSM) geschichtet. Während der Zentrifugation bei  $2000 \text{ min}^{-1}$  für 20 Minuten bilden sich vier Phasen:

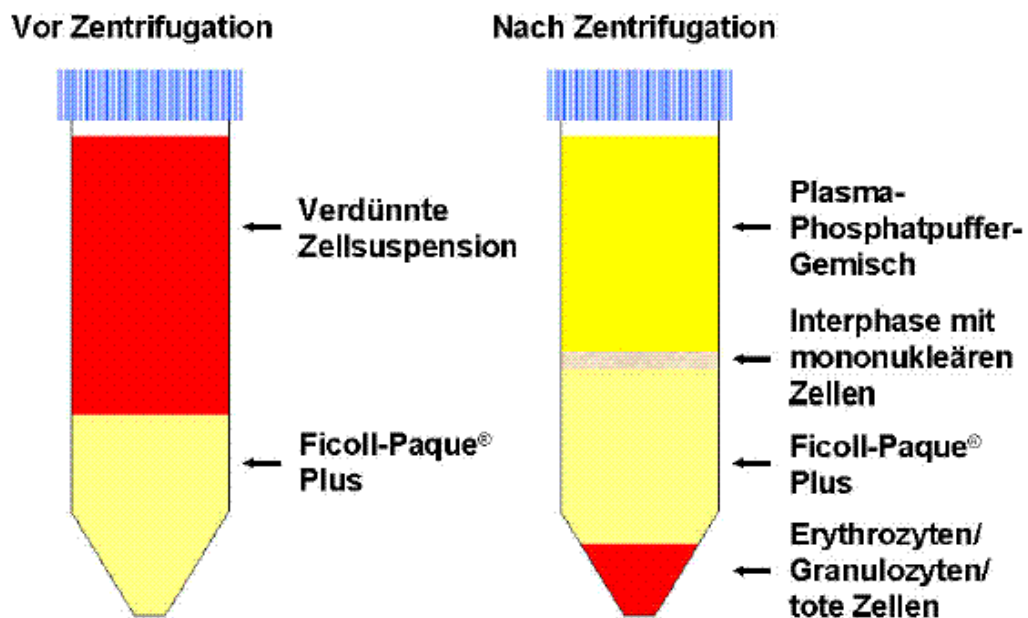


Abb. 9: Isolierung von PBMC mittels Ficoll-Paque® Plus – Technik

Nach Absaugen und zweimaligem Waschen der Phase der mononukleären Zellen im Medium wird das abzentrifugierte Pellet in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen und in der Neubauer - Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Nach erneutem Zentrifugieren für 5 Minuten bei  $2000 \text{ min}^{-1}$  werden die Zellen für 15 Minuten mit 20  $\mu\text{l}$  immunomagnetischen anti-CD-14 Beads und 80  $\mu\text{l}$  MACS-Puffer pro 10 Millionen Zellen inkubiert.

Im Magnetfeld der MACS – Separationssäule, die vorher mit 500 µl MACS - Puffer befeuchtet wird, erfolgt die Positiv - Selektion der mit den magnetischen Beads behafteten Monozyten. Die in der Säule verbleibenden Zellen werden noch dreimal mit 500 µl Puffer aufgereinigt. Sie können im letzten Schritt mit einem Stempel in 1ml MACS - Puffer eluiert werden.

## **4.2 Isolation primärer humaner Darmmakrophagen**

Nach der chirurgischen Resektion erfolgt zunächst das sorgfältige Waschen des Darmstückes in 30 ml PBS. Danach wird die Mukosa von der Muskularis abgetrennt und zum Ablösen des Schleims in 10 ml PBS und 1 mM Dithiothreitol (DTT) bei 37° C 15 min lang geschüttelt (225 rpm). Nach Abtrennen der Schleimreste wird die Mukosa in 10 ml Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) und 2 mM Ethylendiamin-Tetraacetat (EDTA) für weitere 15 min bei 37° geschüttelt. Zum Ablösen der Krypten wird die Mukosa im nächsten Schritt solange in frischem PBS gevortext, bis der Überstand klar ist. Nun wird der Rest des Gewebes zerkleinert und 60 min lang in 1 mg / ml Collagenase, 2 mg / ml Hyaluronidase und 0,3 mg / ml DNase bei 37° geschüttelt. Anschließend können die Lamina Propria mononukleären Zellen (LPMNZs) durch mehrmaliges Vortexen aus der Mukosa herausgelöst werden. Nach zweimaligem Waschen im Medium werden die Zellen in 15 ml RPMI-Medium aufgenommen und über 15 ml Lymphozytenseparationsmedium geschichtet. Nach 20 - minütigem Zentrifugieren bei 2000 min<sup>-1</sup> kann die Phase der Lamina Propria mononukleären Zellen mit einer Pipette abgesaugt werden. Nach zweimaligem Waschen im Medium erfolgt die Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer - Zählkammer. Pro 10 Mio. Zellen werden diese mit 20 µl immunomagnetischen anti – CD33 - Beads und 80 µl MACS - Puffer für 15 min bei 4° C inkubiert. Die mit magnetischen Beads behafteten Makrophagen bleiben im Magnetfeld der MACS-Separationssäule hängen und werden nach dem Eluieren mit einem Stempel in 1 ml MACS-Puffer aufgefangen.

### 4.3 In-vitro differenzierte Makrophagen

Die, wie in 4.1 beschrieben, isolierten Blutmonozyten werden in einer Dichte von  $1 \cdot 10^6$  Zellen / ml mit 2% AB-Serum und 0,5% Penicillin / Streptomycin im Teflonbeutel ausgesät. Nach 7 Tagen im Brutschrank bei 7% CO<sub>2</sub> sind die Monozyten zu in - vitro - differenzierten Makrophagen ausgereift. Da diese an der hydrophoben Teflonfolie nur schwach anhaften, können sie durch eine 30 - minütige Inkubation bei 4°C abgelöst werden.

### 4.4 Gesamt RNA-Isolation und Umschreiben in cDNA

Das Pellet der isolierten Blutmonozyten oder Darmmakrophagen wird nach der Zentrifugation in 350 µl RLT - Puffer (mit β-Mercaptoethanol) durch mehrmaliges auf- und abpipettieren lysiert. Durch fünfmaliges Aufziehen der Zellen mit einer 20-gauge - Kanüle werden die Zellen noch effektiver aufgeschlossen. Bis zur eigentlichen RNA - Isolation kann das Zelllysate bis zu 2 Wochen bei -80° C gelagert werden. Die Isolation der RNA erfolgt mit dem *Rneasy® Mini Kit* der Firma Qiagen. Für die Isolation der RNA wird das Lysat nach dem Auftauen durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette mit 350 µl 70%igem Ethanol in DEPC - Wasser gemischt. Nach dem Auftragen des Gemisches auf eine *RNeasy Mini* - Säule wird bei  $13000 \text{ min}^{-1}$  für 15 sec. zentrifugiert.

Für den DNase - Verdau werden 70 µl RDD - Puffer mit 10 µl DNase auf die Säule aufgetragen und bei RT 15 min. lang inkubiert. Anschließend wird die Säule mit 700 µl RW1 - Puffer gewaschen. Nach 15 - sekündigem Abzentrifugieren bei  $13000 \text{ min}^{-1}$  wird die Säule in ein neues Auffangröhrchen überführt und zweimal mit 500 µl RPE - Puffer gewaschen. Zum Eluieren der RNA wird die Säule mit 30 µl Rnase - freiem Wasser bei  $10000 \text{ min}^{-1}$  für 1 min. zentrifugiert.

Das Umschreiben der RNA in cDNA erfolgt mit dem *Reverse Transcription System* der Firma Promega. Von der isolierten mRNA werden je 27 µl eingesetzt und für 10 min. bei 70° C inkubiert. Anschließend werden je 27 µl des Mastermix, wie in Tabelle1 beschrieben, zugegeben. Es erfolgt eine 15 - minütige Inkubation bei 42° C und anschließend eine 5 - minütige Inkubation bei 99° C. Die so hergestellte cDNA kann bei -20° C tiefgefroren werden.

MgCl <sub>2</sub>	10,7 µl
Oligo (dT <sub>s</sub> )	2,6 µl
dNTPs	5,3 µl
10-fach Puffer	5,3 µl
Reverse Transkriptase	1,6 µl
RNAse Inhibitor	1,3 µl

**Tab. 1: Mastermix für cDNA - Gewinnung**

## 4.5 Quantitative Taqman<sup>®</sup> PCR

Mit Hilfe der quantitativen *Taqman*<sup>®</sup> PCR kann die unterschiedliche Expression bestimmter Gene in unterschiedlichen Zellen oder aus Geweben verschiedener Krankheiten nachgewiesen werden.

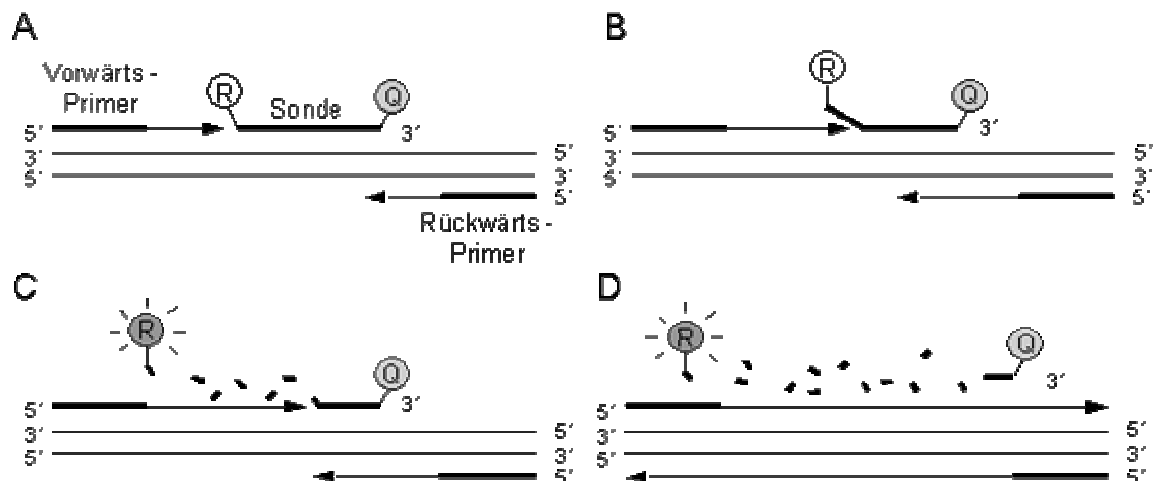
Hierfür erfolgt zunächst die Denaturierung der DNA-Doppelstränge bei 94° C; während des schnellen Abkühlens auf 50° C lagern sich Primer und Sonden an. Die Sonde ist am 3' - Ende mit einem Reporter - Farbstoff 6-FAM (6-Carboxy-fluorescein) und am 5' - Ende mit einem Quencher - Farbstoff TAMRA (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin) gelabelt.

In räumlicher Nähe unterdrückt der Quencher - Farbstoff das Signal des Reporters.

Beim wiederholten Erhitzen auf 95°C erfolgt die Elongation:

Die 5'-3' Exonukleaseaktivität der DNA - Taq - Polymerase bewirkt die Verdrängung und Spaltung der Sonde.

Durch die räumlichen Trennung zwischen Reporter- und Quencher-Farbstoff wird das Fluoreszenzsignal des Reporters ausgelöst und kann detektiert werden. Bei jeder Amplifikation wird das Reportersignal verstärkt und dient der Berechnung der relativen DNA-Menge in der Probe. Die Genexpression wird auf die Expression des ubiquitär vorhandenen house - keeping Gen GAPDH, das mit dem Farbstoff Vic gelabelt ist, relativiert.



**Abb. 10: Prinzip der Taqman - PCR:**

A: Extension (R = Reporter, Q = Quencher),

B: Ausbildung der Y-förmigen Sekundärstruktur,

C: Sondenhydrolyse,

D: Abschluß der Polymerisation

Die Reaktion erfolgt in einem Volumen von 20 µl, wobei für jede Probe eine 3 - fache Bestimmung erfolgt. Die Primer und Sonden für NALP2 und NALP3 werden von der Firma MWG - Biotech synthetisiert. Die Volumina der einzelnen Komponenten für einen 1 - fachen *Taqman*® PCR Ansatz sind in Tabelle2 ersichtlich:

ABI - <i>Taqman</i> ® Mastermix (20-fach)	10µl
Primer forward (18 µM)	1µl
Primer reverse (18 µM)	1µl
Sonde (5 µM)	1µl
cDNA	1 oder 2 µl
Wasser	5 µl
GAPDH	1 µl

**Tab. 2: 1 - facher *Taqman*® PCR Ansatz**

Anschließend wurden die Ansätze auf eine 384-well Platte pipettiert und mittels dem Sequence Detection System (PE Applied Biosystems) gemessen. Tabelle3 zeigt die Amplifikationsbedingungen:

50°C	2 min.	} 50 Zyklen
95°C	10 min.	
95°C	15 sec.	
60°C	1 min.	

**Tab. 3: Amplifikationsbedingungen der *Taqman*® PCR**

Die während der 45 Zyklen freiwerdende Menge des Reporter - Farbstoffs wurde mittels der *Sequence Detector Software SDS 2.1* (PE Applied Biosystems) gemessen. Die Fluoreszenz wurde gegen die Zyklenzahl aufgetragen. In der exponentiellen Phase der Kurve wird eine Gerade gezogen, welche den Detektionsschwellenwert für die Fluoreszenz darstellt. Die Zyklenzahl, bei der diese Baseline überschritten wird, nennt man Ct (Cycler Threshold) – Wert.

Für die Berechnung der Expressionsunterschiede von NALP2 und NALP3 in Makrophagen aus gesundem versus chronisch entzündetem Darmgewebe, wird für jede Probe der Ct - Wert des house - keeping Gens vom Ct - Wert des gesuchten Gens abgezogen (dCt). Aus der 3 - fach Bestimmung wird der Mittelwert gebildet.

Der dCT - Wert der Kontrollgruppe wurde vom dCt-Wert der CED-Gruppe abgezogen:

$$\text{ddCt} = \text{dCt (CED)} - \text{dCT (Kontrolle)}$$

Die relative cDNA - Standardkonzentration wird unter Berücksichtigung der exponentiellen Amplifikation berechnet:

$$X = 2^{-\text{ddCT}}$$

Die statistische Auswertung der *Taqman*<sup>®</sup> - Ergebnisse erfolgt durch die Darstellung als Mittelwert +/- SEM (standard error of the mean) oder mittels Boxplot. Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten verschiedener Gruppen werden ab einem p-Wert < 0,05 signifikant.

## 4.6 Proteinbestimmung und Westernblot

### 4.6.1 Lyse der Monozyten und Makrophagen

Die isolierten Blutmonozyten und intestinalen Makrophagen werden nach 5 - minütiger Zentrifugation bei 2000 min<sup>-1</sup> in RIPA - Puffer lysiert. Nach einer 25 - minütigen Inkubation auf Eis wird erneut 5 min. bei 13000 min<sup>-1</sup> zentrifugiert. Der Überstand enthält das gesamte Protein der lysierten Zellen und wird bei -20°C gelagert.

## 4.6.2 Proteinbestimmung

Zur photometrischen Bestimmung des Proteingehalts werden je 10 µl der Lysate in einer 96-well - Platte in Doppelbestimmung aufgetragen. Zum Vergleich wird ein BCA (bicinchoninic – acid) - Proteinstandard bekannter Konzentration mitpipettiert. Anschließend wird das Entwicklungsreagenz, bestehend aus 50 Teilen BSA - Lösung und einem Anteil Kupfer-II-Sulfat-Lösung zugegeben und für 30 min bei 37° C und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert. In der wässrig alkalischen Lösung wird das Cu<sup>2+</sup>- Ion zu Cu<sup>1+</sup> reduziert und bildet mit zwei BCA - Molekülen einen farbigen Komplex.

Mit Hilfe des ELISA - Readers kann die Adsorption bei 562 nm gemessen werden. Anhand der Standardkonzentration wird eine Eichgerade erstellt, dieser der Proteingehalt der jeweiligen Lysate abgelesen wurde.

## 4.6.3 Westernblot

Mit der Methode des so genannten Western - Blotting ist es möglich, Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen und anschließend zu identifizieren.

Nach dem Auftragen der bei 95° C denaturierten Proteinproben und des Standards findet die elektrophoretische Auftrennung im Bis - Tris - Gel bei 200 V und 400 mA für 90 min. statt. Anschließend wurde das Gel für 105 min. bei 30 V und 110 mA auf eine Nitrocellulosemembran geblottet.

Die Membran wird nach dem Blotten für 30 min. in einer Blocklösung aus Waschpuffer mit 4% Milchpulver bewegt. Danach wird der primäre Antikörper für NALP2 bzw. NALP3 je 1 : 800 in 7 ml Blocklösung für 90 min. auf die Membran gegeben. Nach dreimaligem Waschen für 10 min. kann der passende biotinylierte Sekundärantikörper Anti – rabbit 1 : 5000 gegen NALP2 und Anti - mouse 1 : 3000 gegen NALP3 je in 7 ml Blocklösung auf die Membran gegeben werden und 45 min. bewegt werden. Nach dreimaligem Waschen erfolgt eine enhanced chemiluminescence (ECL) - Entwicklung mit einem fertigen Kit für 5 min. Anschließend wird die Membran umgeben von Klarsichtfolie in eine Röntgenkassette gelegt und mit einem *ECL<sup>TM</sup> Hyperfilm* für 5 min. inkubiert und entwickelt.



## 4.7 Immunhistochemie

Die Methode der Immunhistochemie ermöglicht den Nachweis und die Lokalisation intra- oder extrazellulärer Proteine in Gewebe und Zellen mit Hilfe spezifischer Antikörper.

Die Biopsien für die Immunhistochemie stammen aus Darmgewebe gesunder Patienten bzw. aus entzündeten Darmbereichen von Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa - Patienten. Sie sind in Paraffin eingebettet. Die Entparaffinierung und Rehydrierung der 5 µm dicken Paraffinschnitte erfolgte in der Xylol- / Ethanolreihe:

Xylol	5 min.
Xylol	5 min.
Ethanol 100%	2 min.
Ethanol 100%	2 min.
Ethanol 90%	2 min.
Ethanol 70%	2 min.

**Tab. 4: Xylol- / Ethanolreihe für die Immunhistochemie**

Zur Demaskierung werden die Schnitte in 1x Citratpuffer gegeben und in der Mikrowelle 30 min. bei 250 W erhitzt. Um die Aktivität der endogenen Peroxidasen der Zellen im Gewebeschnitt zu senken, werden die Objektträger für 30 min. in 0,3%iger Wasserstoffperoxidlösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS erfolgt zum Blockieren unspezifischer Bindungen eine 30 - minütige Inkubation in der Blockierlösung (1% BSA in PBS). Nach weiterem Waschen in PBS erfolgt die Inkubation der Schnitte mit dem Primärantikörper bzw. Isotypen mit 100 µl pro Schnitt für ein Stunde in feuchter Umgebung. Der Primärantikörper für NALP2 bzw. NALP3 wird in einer Konzentration von 1 : 300 in Blocklösung aufgetragen. Der Isotyp für NALP2 wird 1 : 2000, der Isotyp für NALP3 1 : 300 in Blocklösung aufgetragen.

Nach zweimaligem Waschen erfolgt die Inkubation mit dem biotinyliertem Sekundärantikörper Anti - rabbit für NALP2 und anti - mouse für NALP3 je in der Konzentration 1 : 800 für eine Stunde. Nach zweimaligem Waschen kann die ABC (Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex) - Lösung für 30 min. aufgetragen werden. Nach erneutem Waschen erfolgt die Färbung der Schnitte mit dem *VectorRed*-Fertigkit unter dem Mikroskop.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Quantitative Expression von NALP2 und NALP3 in Monozyten und Makrophagen aus gesunder versus chronisch entzündeter Darmmukosa

Durch die Beteiligung von NALP2 und NALP3 an der Bildung des Inflammasoms und damit der Aktivierung der Caspase-1, mündet diese in der Spaltung von pro-IL-1 $\beta$  in seine aktive Form IL-1 $\beta$ . Damit spielen die NALPs im Geschehen von chronischen Entzündungsprozessen eine zentrale Rolle.

In der Vergangenheit konnte in mehreren Arbeitsgruppen eine vermehrte Aktivierung von Caspase-1 und Interleukin-1 $\beta$  in den Makrophagen aus der Mukosa von Patienten, die an einer Chronisch entzündlichen Darmerkrankung leiden, nachgewiesen werden [33, 48, 49, 50].

Aus dieser Erkenntnis stammt die Idee dieser Arbeit, eine vermehrte Expression von NALP2 und NALP3 in Makrophagen aus der Mukosa von CED-Patienten nachzuweisen.

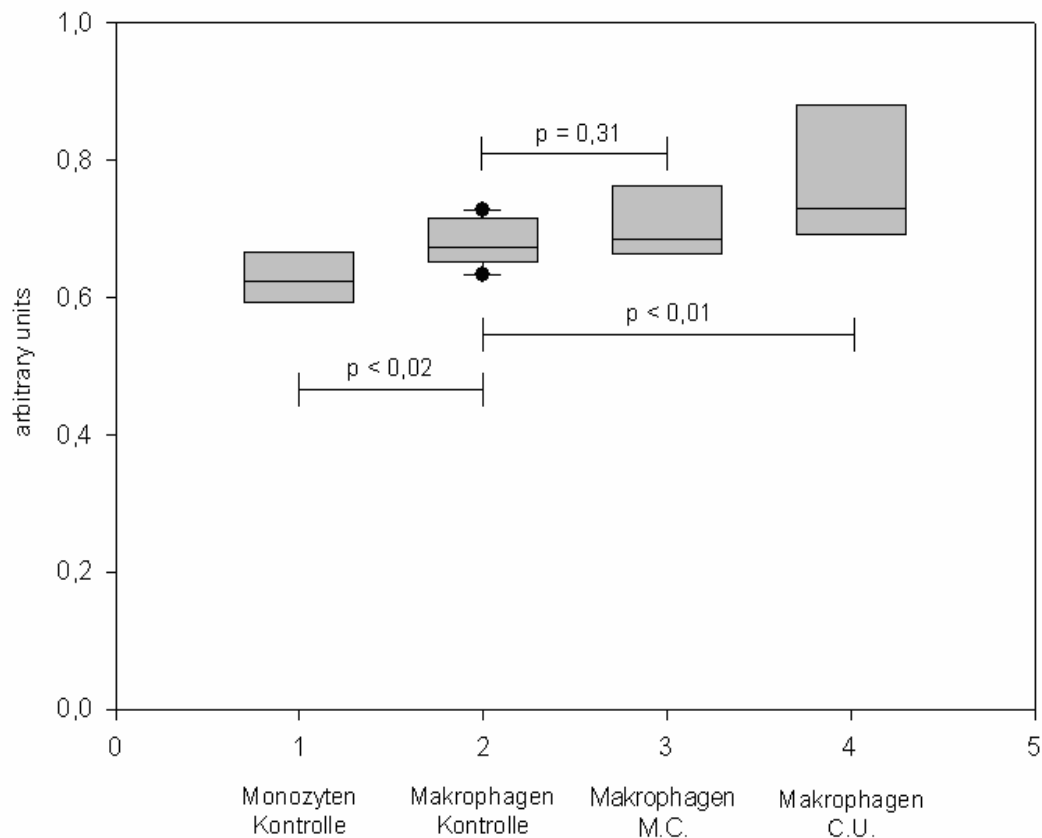
Dazu sollte in einem ersten Teil mittels Taqman<sup>®</sup> PCR ein quantitativer Vergleich der Expression von NALP2 und NALP3 in gesunden Monozyten und Makrophagen im Vergleich zu denselbigen, isoliert aus chronisch entzündeter Mukosa, aufgestellt werden.

Die Aufreinigung dieser Zellen erfolgte nach dem etablierten Protokoll von Bull and Bookman [46] unter Zuhilfenahme von mit magnetischen Beads gekoppelten Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD 14 für Monozyten und CD 33 für Makrophagen. So gewonnene Zellen sind, wie in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt [17, 47], bis zu 95% reine Populationen. Die aus diesen Zellen gewonnene mRNA konnte, in cDNA umgewandelt, für die quantitative Taqman<sup>®</sup> PCR eingesetzt werden.

Für die erste Messung der genauen Expressionsunterschiede von NALP2 wurden zunächst sechs Monozyten-Proben aus dem Blut gesunder Probanden isoliert. Da aus den im Blut zirkulierenden Monozyten die Darmwand - ständigen Makrophagen differenzieren, wurden weiterhin 10 Proben solcher Darmmakrophagen aus nicht entzündeter Mukosa, zum Beispiel von Patienten die an einer Divertikulitis leiden, gewonnen.

Für den Vergleich entzündet versus nicht entzündet wurden 3 Proben Darmmakrophagen von M.C.-Patienten und 5 Proben Darmmakrophagen von C.U.-Patienten isoliert. Wegen zu hoher Zyklenzahlen (ab > 34 Zyklen), d. h. zu wenig NALP2 - mRNA, konnten viele Patientenproben nicht in die Auswertung mit einfließen.

Abbildung 11 zeigt, dass Darmmakrophagen aus gesunder Mukosa signifikant mehr NALP2 exprimieren ( $p = 0,02$ , t-test) als Blutmonozyten. Zwischen Makrophagen aus entzündeter Mukosa von Morbus Crohn - Patienten und solchen aus gesunder Mukosa besteht kein deutlicher Expressionsunterschied ( $p = 0,31$ , t-test). Allerdings zeigte sich mit  $p = 0,01$  (t-test) ein signifikanter Unterschied zwischen Makrophagen aus nicht entzündeter Mukosa versus solcher aus Mukosa von C.U.-Erkrankten. Die Makrophagen aus der chronisch entzündeten Mukosa exprimieren wesentlich mehr NALP2 als Makrophagen gesunder Darmschleimhaut.

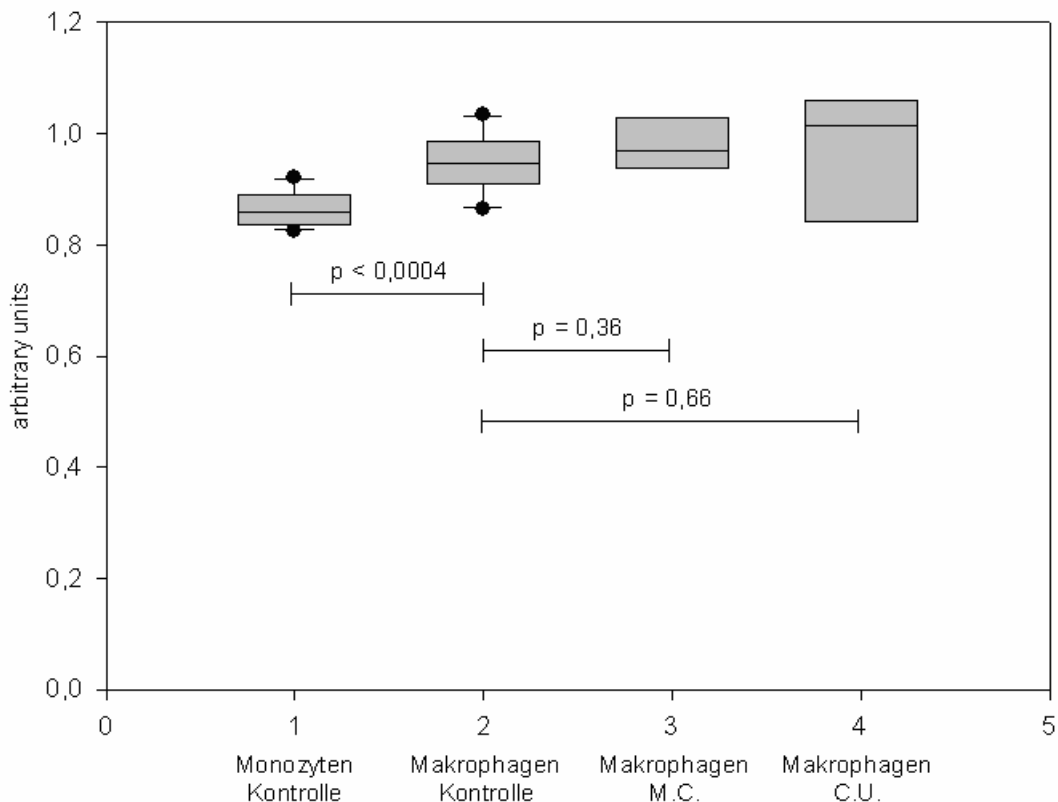


**Abb. 11: Real-time-PCR (Taqman®) für NALP2**

In Makrophagen gesunder Mukosa befindet sich deutlich mehr NALP2 mRNA als in Blutmonozyten gesunder Probanden ( $p = 0,02$ ). Zwischen Makrophagen aus entzündeter Mukosa von M.C. - Patienten versus Makrophagen aus gesunder Mukosa besteht kein erkennbarer Unterschied ( $p = 0,31$ ). Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,01$ ) im Vergleich von Makrophagen gesunder Mukosa versus solcher aus entzündeter Mukosa von C.U.-Patienten.

Für die quantitative Bestimmung der mRNA von NALP3 wurden 12 Proben Blutmonozyten gesunder Probanden isoliert. Für den Vergleich chronisch entzündeter versus nicht entzündeter Schleimhaut wurden 9 Proben Darmmakrophagen aus gesunder Mukosa, 6 Proben Darmmakrophagen aus entzündeter Mukosa von M.C. - Patienten und 5 Proben dieser Abwehrzellen aus entzündeten Darmabschnitten von C.U.-Patienten isoliert.

Abbildung 12 zeigt, dass in den intestinalen Makrophagen gesunder Mukosa mit  $p = 0,0004$  (t-test) signifikant mehr NALP3 - mRNA exprimiert wird, als in Blutmonozyten gesunder Probanden. Zwischen Makrophagen aus M.C.- bzw. C.U.-Patienten besteht im Vergleich zu Makrophagen aus gesunder Mukosa mit  $p = 0,36$  (t-test) bzw.  $p = 0,66$  (t-test) kein signifikanter Unterschied in der NALP3 – Genexpression.



**Abb. 12 : Real-time-PCR (Taqman®) für NALP3**

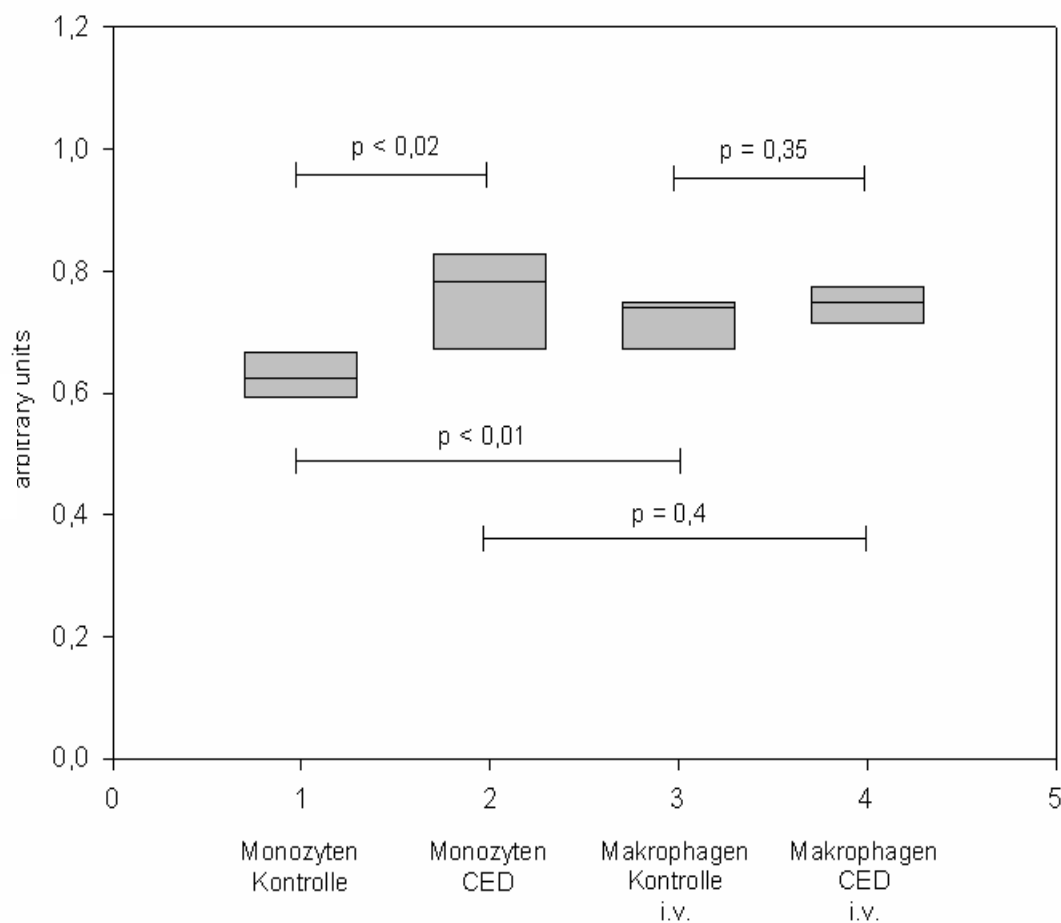
Es befindet sich signifikant mehr NALP3 in intestinalen Makrophagen ( $p = 0,0004$ ) als in Blutmonozyten gesunder Probanden. Zwischen Makrophagen aus entzündeter M.C.- bzw. C.U.- Mukosa und Makrophagen aus gesunder Mukosa besteht kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,36$  bzw.  $p = 0,66$ ).

## 5.2 Genexpression von NALP2 und NALP3 in in vitro differenzierten Makrophagen

In einer weiteren Versuchsreihe sollte die NALP2 - und NALP3 - Genexpression in in vitro differenzierten Makrophagen untersucht werden. Hierfür wurden die isolierten Blutmonozyten über 7 Tage mit AB-Serum im Brutschrank inkubiert. Für NALP2 wurden von 5 gesunden Probanden und von 7 CED - Patienten Blutmonozyten isoliert und differenziert.

In Abbildung 13 zeigt sich, dass in Blutmonozyten von CED - Erkrankten mit  $p = 0,02$  (t-test) signifikant mehr NALP2 exprimiert wird im Vergleich zu Kontroll – Blutmonozyten. Lässt man die Monozyten gesunder Probanden in

in vitro zu Makrophagen differenzieren, steigt die NALP2 - Genexpression signifikant an ( $p = 0,01$ , t-test). Dies gilt allerdings nicht für die in vitro differenzierten Makrophagen von Patienten die an einer Chronisch entzündlichen Darmerkrankung leiden, hier besteht mit  $p = 0,4$  (t-test) kein erheblicher Unterschied. Auch zwischen den in vitro differenzierten Kontroll - Makrophagen im Vergleich zu den in vitro differenzierten CED – Makrophagen zeigte sich kein wesentlicher Anstieg in der Genexpression von NALP2 ( $p = 0,35$ , t - test).



**Abb. 13: Real-time-PCR (Taqman®) für NALP2**

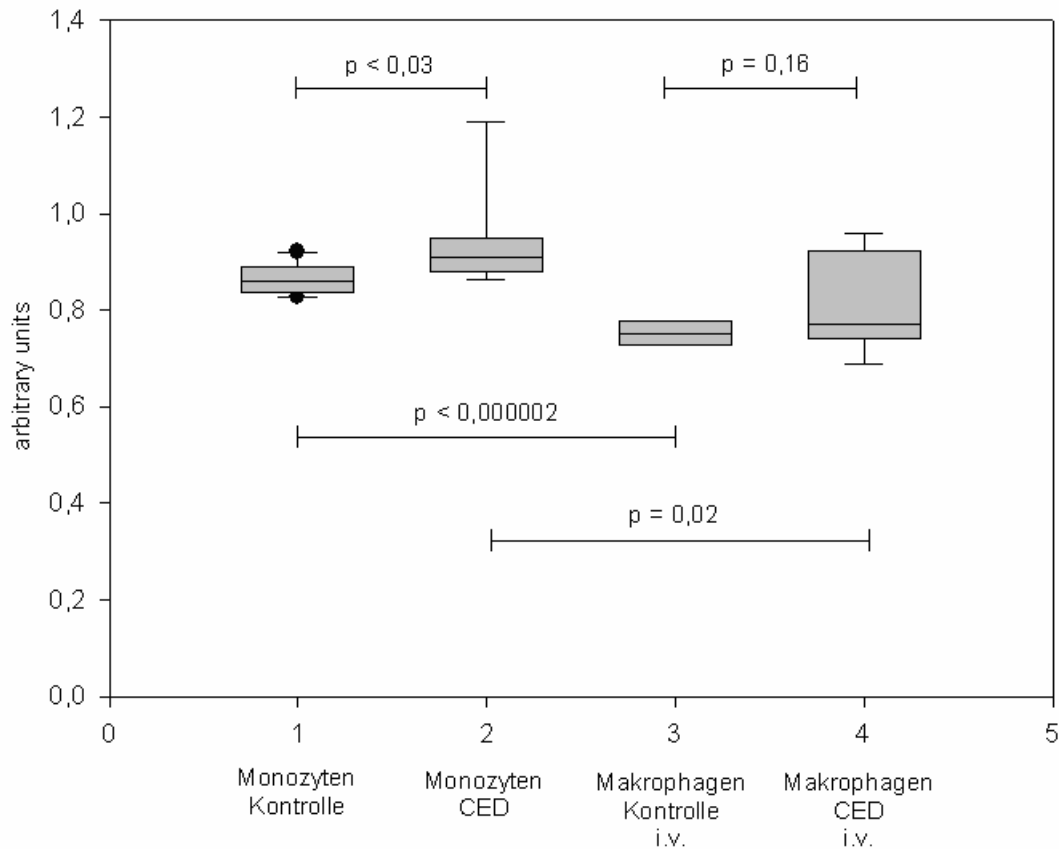
Im Vergleich von Kontroll - Monozyten zu solchen von Patienten die an einer CED leiden besteht ein signifikanter Unterschied in der NALP2 Expression ( $p = 0,02$ ). Auch die in vitro differenzierten Makrophagen exprimieren signifikant mehr NALP2 als die zugehörigen Blutmonozyten ( $p < 0,01$ ). Dieser Unterschied gilt nicht für die in vitro differenzierten Makrophagen CED -Kranker versus der zugehörigen Blutmonozyten ( $p = 0,4$ ). Auch weisen diese i. v. differenzierten Makrophagen von CED – Patienten keine wesentlich größere NALP2 – Expression auf als die i. v. differenzierten Kontroll Makrophagen ( $p = 0,35$ ).

Für die in vitro Generierung von Makrophagen für den quantitativen Vergleich der Genexpression von NALP3 wurden von 9 Patienten, die an einer Chronisch entzündlichen Darmerkrankung leiden, Blutmonozyten isoliert.

Kontroll – Monozyten wurden von insgesamt 6 Probanden isoliert und inkubiert. Es zeigte sich auch hier (Abb. 14), dass in den Blutmonozyten von CED – Patienten signifikant mehr ( $p = 0,03$ , t-test) NALP 3 exprimiert wird als in Blutmonozyten gesunder Probanden.

Lässt man die Kontroll – Blutmonozyten in vitro zu Makrophagen differenzieren sinkt hier die Genexpression von NALP3 signifikant ( $p = 0,000002$ , t-test). Dasselbe gilt für das Verhältnis der in vitro differenzierten Makrophagen von CED – Patienten im Vergleich zu ihren Blutmonozyten ( $p = 0,02$ , t-test). Allerdings zeigt sich kein wesentlicher Unterschied mehr zwischen den in vitro differenzierten Kontrollmakrophagen im Vergleich zu den in vitro differenzierten Makrophagen von Patienten mit Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa ( $p = 0,16$ , t-test).





**Abb. 14 : Real-time-PCR (Taqman®) für NALP3**

Die Expression von NALP3 ist bei den i. v. differenzierten Makrophagen gesunder Mukosa signifikant niedriger als in den dazugehörigen Blutmonozyten ( $p = 0,000002$ ). Auch in den i. v. differenzierten Makrophagen von Patienten mit M.C. oder C.U. wird wesentlich weniger NALP3 exprimiert als in den dazugehörigen Blutmonozyten ( $p = 0,02$ ). Allerdings ist die Genexpression von NALP3 in Blutmonozyten von CED – Patienten mit  $p = 0,03$  signifikant höher im Vergleich zu Kontroll - Blutmonozyten. Es zeigt sich kein wesentlicher Unterschied für NALP3 zwischen i. v. differenzierten Kontrollmonozyten und solchen von CED – Patienten ( $p = 0,16$ ).

## **5.3 Nachweis von NALP2 und NALP3 auf Proteinebene**

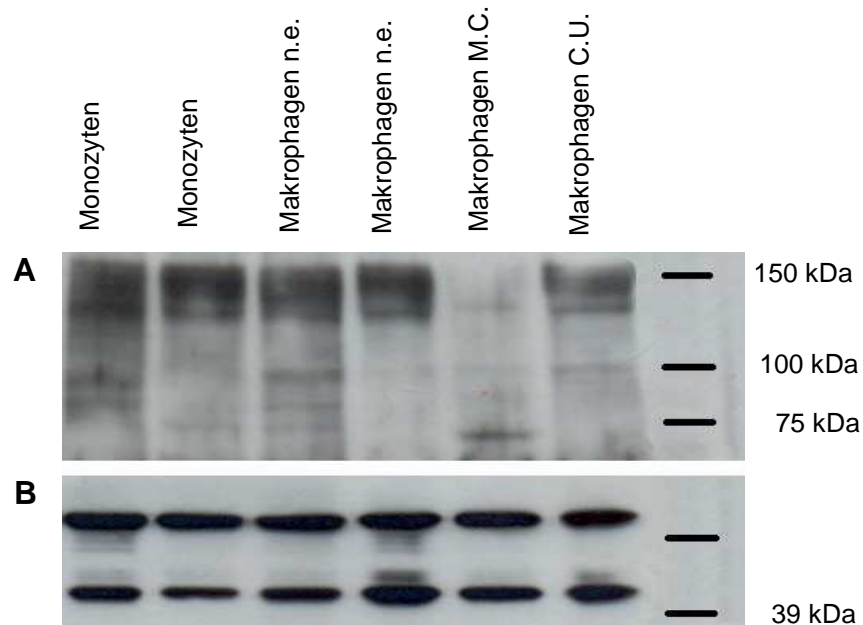
### **5.3.1 Westernblot**

Basierend auf den Ergebnissen der mRNA – Expression in der Taqman<sup>®</sup> PCR konnte darauf geschlossen werden, dass die Differenzierung von Blutmonozyten zu intestinalen Makrophagen zu einer Induktion der NALP2 - und NALP3 - Gen-expression führt. Weiterhin zeigen auch die Makrophagen die aus entzündeter Mukosa gewonnen wurden, tendenziell eine Steigerung der Expression der gesuchten Gene.

Um diese Unterschiede der NALP2 - bzw. NALP3 - Expression auch auf Proteinebene zu verifizieren, sollte zunächst der Westernblot für NALP3 durchgeführt werden.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte im Bis – Tris – Gel. Nachdem die Membran mit 4% Magermilchpulver in Waschpuffer blockiert worden war, erfolgte über Nacht bei 4°C die Inkubation mit dem Antikörper gegen NALP3 in einer Konzentration von 1 : 800. Als zweiter Antikörper wurde der passende biotinylierte Sekundärantikörper anti – mouse in einer Konzentration von 1 : 3000 eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mit dem ECL – Reagenz. Zur Ladungskontrolle wurde Aktin bei einer erwarteten Größe von 40 kDa nachgewiesen.

Das NALP3 – Protein sollte bei einer Größe von 118 kDa nachzuweisen sein. Das verwendete Material waren Lysate von Monozyten bzw. Makrophagen aus nicht entzündeter Mukosa und stark entzündeter Mukosa von Morbus Crohn - und Colitis ulcerosa – Patienten.



**Abb 15: (A) Westernblot für NALP3**

In den Spuren aufgetragen von rechts nach links: 2 Spuren Blumonozyten gesunder Probanden, 2 Spuren Makrophagen gesunder Mukosa zur Kontrolle, Makrophagen entzündeter Mukosa von Morbus Crohn - bzw. Colitis ulcerosa – Patienten. Die eingesetzte Proteinmenge waren je 30 µg. Bei 118 kDa ist für NALP3 keine Bande nachzuweisen. Die Ladungskontrolle **(B)** erfolgte im Aktinblot mit einer Größe von 40 kDa. Diese Abbildung ist repräsentativ für fünf voneinander unabhängigen Experimenten.

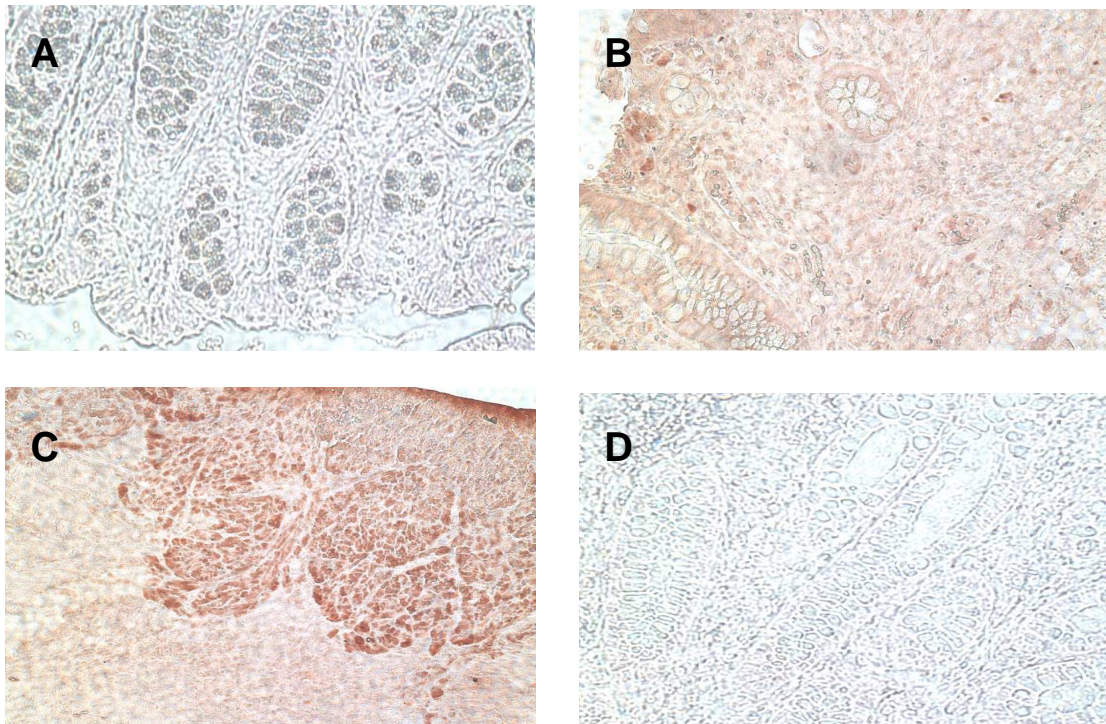
Wie in Abbildung 15 ersichtlich, konnte in keiner der Patientenproben NALP3 nachgewiesen werden. Dies gilt auch für fünf weitere Experimente mit unterschiedlichem Patientenproben und Optimierung der Versuchsbedingungen hinsichtlich Proteinmenge, Antikörperkonzentration und Entwicklungszeit des Films. Aufgrund der Limitierung des Probenmaterials von Patienten mit Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen konnte kein Nachweis von NALP3 im Westernblot gelingen.

### 5.3.2 Immunhistochemie

Um doch auf Proteinebene nachzuweisen, dass die Expression von NALP2 und NALP3 während der Differenzierung von Monozyten zu Darmwand – ständigen Makrophagen tatsächlich induziert wird, sollten diese abschließend noch in der Immunhistochemie mittels spezifischer Antikörper dargestellt werden. Auch hier sollte ein Vergleich zwischen nicht entzündeter Mukosa und entzündeter Mukosa von Patienten die an einer Chronisch entzündlichen Darmerkrankung leiden, aufgestellt werden.

Hierfür wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte intestinaler Mukosa mit einem polyklonalem Antikörper gegen NALP2 bzw. einem monoklonalen Antikörper gegen NALP3 inkubiert. Mit Vector® NovaRed™ erfolgte die Visualisierung der gesuchten Proteine.

Es zeigte sich, dass sowohl in entzündeter Morbus Crohn – Mukosa (Abb. 16B) als auch entzündeter Colitis ulcerosa – Mukosa (Abb. 16C) NALP2 nachgewiesen werden kann. Es zeigte sich jedoch ein relativ unspezifischer Verteilungstyp des NALP2 – Proteins in der Mukosa. In der nicht entzündeten Kontroll - Mukosa ist kein Nachweis des gesuchten Proteins möglich (Abb. 16A). Eine unspezifische Färbung durch den verwendeten Antikörper ist auszuschließen, da die Isotypenkontrolle keine Färbung aufweist (Abb. 16D).



**Abb. 16: Immunhistochemie für NALP2**

A: Kontroll – Mukosa: keine Färbung nachweisbar

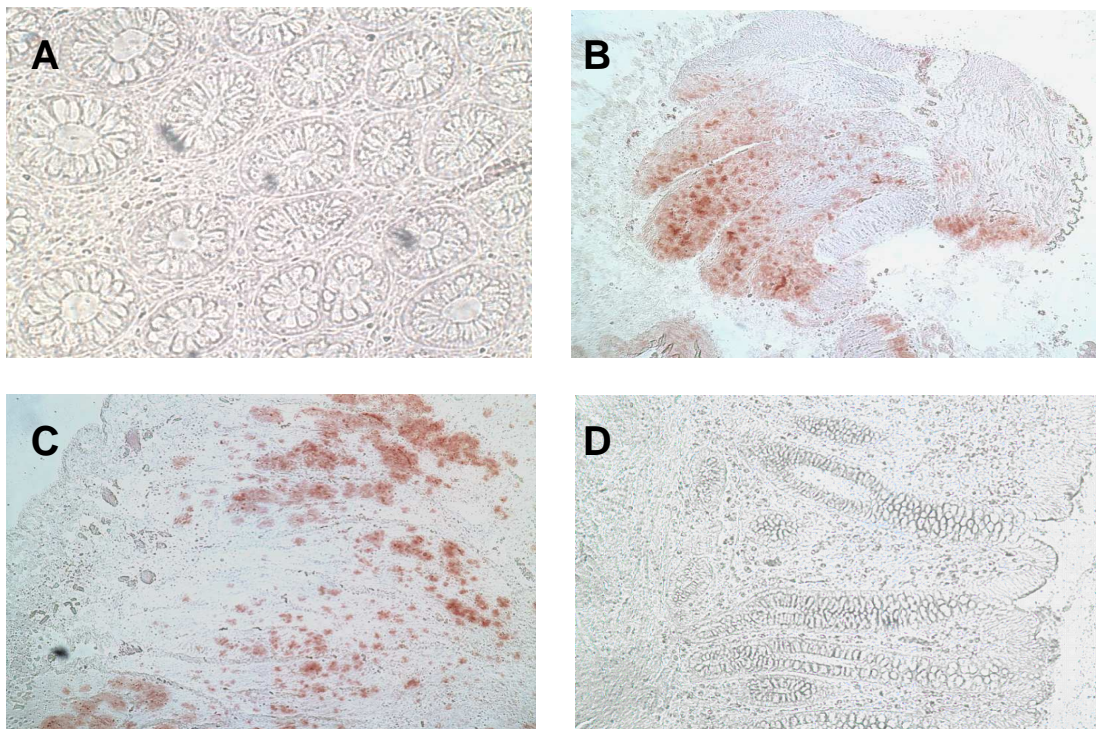
B: M.C. – Mukosa: unspezifische Färbung der gesamten Mukosa

C: C.U. – Mukosa: Färbung des NALP2 – Proteins

D: Isotypen – Kontrolle: keine Färbung nachweisbar

Diese Abbildung zeigt eine repräsentative Färbung von insgesamt vier unabhängigen Experimenten

Auch für NALP3 konnte ein ähnliches Ergebnis erzielt werden. In der entzündeten Mukosa von Morbus Crohn - und Colitis ulcerosa – Patienten konnte eine vermehrte Expression von NALP3 nachgewiesen werden (Abb. 17B, C). In den Schnitten der nicht entzündeten Mukosa zur Kontrolle, konnte keine Färbung erkannt werden (Abb. 17A). Zum Ausschluss einer unspezifischen Färbung des verwendeten Antikörpers gegen NALP3 wurde die Isotypenkontrolle durchgeführt. Wie in Abbildung 17D ersichtlich, zeigt diese ein negatives Ergebnis der Färbung.



**Abb. 17: Immunhistochemie für NALP3**

- A: Kontroll – Mukosa: keine Färbung
- B: M.C. – Mukosa: spezifische Anfärbung von NALP3
- C: C.U. – Mukosa: spezifische Anfärbung von NALP3
- D: Isotypenkontrolle: keine Färbung nachweisbar



## 6. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war der Nachweis einer vermehrten Expression der *pattern recognition receptors* NALP2 und NALP3 in der Monozyten / Makrophagen – Zellreihe von Patienten mit Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.

Dazu sollte zunächst eine quantitative Bestimmung der Genexpression mittels Taqman® PCR durchgeführt werden. Die vorliegenden Expressionsunterschiede sollten im Weiteren auch auf Proteinebene mit Hilfe der Methoden des *Western Blottings* und der Immunhistochemie verifiziert werden.

Im Folgenden sollen nun die Ergebnisse der jeweiligen Versuche beschrieben und deren Vor – und Nachteile näher erörtert werden.

### 6.1 Quantitative Expressionsunterschiede von NALP2 und NALP3 in Monozyten und Makrophagen gesunder versus chronisch entzündeter Mukosa mittels Taqman® PCR

In dieser Versuchsanordnung zeigte sich, dass in den Darmwand – ständigen Makrophagen sowohl die Expression von NALP2 als auch die von NALP3 wesentlich höher ist als in Blutmonozyten. Da sich Makrophagen aus den im Blut zirkulierenden Monozyten differenzieren, scheint die Migration dieser Zellen in die Darmwand ein Stimulus für die Genexpression von NALP2 und NALP3 darzustellen. Dies würde im Gegensatz zu der Annahme stehen, dass es sich bei den intestinalen Makrophagen um einen, im Vergleich zu den Blutmonozyten, sehr inerten Phänotyp handelt mit einer Herabregulierung der Oberflächenmoleküle wie CD14 als LPS–Rezeptor oder den T–Zell co–stimulatorischen Molekülen (siehe 1.) [16, 17, 18]. Diese Modifizierung der Oberflächenmoleküle schützt vor einer überschießenden Immunreaktion.

Im Gegenteil würde eine verstärkte Expression von NALP2 und NALP3 zu einer Verstärkung der Immunantwort führen. Allerdings muss hier kritisch erwähnt

werden, dass die Därme für die Gewinnung der „Kontroll-Makrophagen“ nicht von gesunden Probanden stammen. Bei den meisten Patienten lag eine Divertikulitis oder eine Carcinom – Erkrankung vor (siehe 3.), die zur Resektion eines Darmstücks führte. Doch muss davon ausgegangen werden, dass es bei diesen Erkrankungen im umliegenden Gewebe zu Immunreaktionen kommen könnte, die bis heute noch nicht geklärt sind und was bei der Isolation der Zellen makroskopisch nicht als entzündete Mukosa erkannt wird. Somit könnten diese Makrophagen einen schon aktivierten Phänotyp zeigen und nicht repräsentativ für „gesunde“ Zellen stehen.

Diese Tatsache muss auch bei der weiteren Bewertung der Ergebnisse der Real – Time – PCR (Taqman<sup>®</sup>) berücksichtigt werden.

Im Vergleich von Makrophagen aus entzündeter versus nicht entzündeter Mukosa zeigt sich für NALP2 ein signifikanter Anstieg der Genexpression in den Makrophagen, die aus der stark entzündeten Schleimhaut von Colitis ulcerosa – Patienten gewonnen wurde. Dies gilt jedoch nicht für die Zellen, die aus der Mukosa von Morbus Crohn – Erkrankten gewonnen wurde. Hier zeigt sich kein Anstieg der NALP2 – Expression. Dies kann mit der geringen Fallzahl von nur 3 Patienten für M.C. begründet werden. Insgesamt mussten für die Taqman<sup>®</sup> PCR für NALP2 eine große Zahl an Proben aus der Wertung genommen werden, da eine zu hohe Zyklenzahl (>35 Zyklen) mit einer zu geringen Expression des gesuchten Gens gleichzusetzen ist und somit eine statistisch relevante Auswertung nicht mehr möglich ist.

Dieses Problem stellte sich bei der PCR für NALP3 nicht, was zeigt, dass in allen untersuchten Zellarten insgesamt mehr NALP3 als NALP2 exprimiert wird. Aber auch bei NALP3 ist die Fallzahl für Chronisch entzündliche Darmerkrankung eher gering, da die Resektion eines befallenen Darmstücks als Therapie die letzte Option darstellt und somit häufig nicht durchgeführt wird. Für NALP3 konnte weder in den Makrophagen von Morbus Crohn – Patienten noch in denen von Colitis ulcerosa – Patienten eine vermehrte Expression nachgewiesen werden.

Bisher wurde zwar viel Forschungsarbeit bezüglich NALPs betrieben, jedoch nicht im Zusammenhang mit Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Es ist lediglich bekannt, dass die Makrophagen aus CED Därmen übermäßig viel



IL-1 $\beta$  produzieren [48, 49, 50]. Diese Tatsache könnte damit erklärt werden, dass in der Kaskade, die letztendlich zur Bildung der aktiven Form von IL-1 $\beta$  führt (siehe 1.), die NALPs mit einer Induktion ihrer Expression zur vermehrten Bildung von IL-1 $\beta$  führen.

Ein weiterer Hinweis für diese Vermutung könnten die bereits 20 bekannten Mutationen im NALP3 sein, die zu einer Induktion dessen Aktivität führen. Diese Mutationen findet man in autoinflammatorischen Erkrankungen wie dem Muckle – Wells Syndrome (MWS), dem familial cold autoinflammatory syndrome (FCAS) und vor allem dem Familiärem Mittelmeerfieber (FMF) [32, 33]. Interessanterweise berichtet Suri 2007 in diesem Zusammenhang über ein 8–14 fach erhöhtes Risiko eine CED zu entwickeln, wenn ein Patient bereits an einem FMF leidet, also eine schon bekannte Mutation im NALP3 vorliegt [51]. All diese Hinweise scheinen für eine Beteiligung der NALPs an der Entstehung von CED zu sprechen.

In den bisherigen Ergebnissen der Arbeit konnte jedoch vor allem für NALP3 noch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen CED und einer Induktion der NALP2 / 3 - Expression gefunden werden.

## **6.2 Expression von NALP2 und NALP3 in in vitro differenzierten Makrophagen von CED – Patienten**

In einer weiteren Versuchsanordnung konnte gezeigt werden, dass in den Blutmonozyten von CED – Patienten sowohl wesentlich mehr NALP2 als auch mehr NALP3 exprimiert wird als in den Blutmonozyten gesunder Probanden.

Diese Zellen scheinen also auch schon in der Blutbahn, nicht erst nach dem Auswandern in die Darmwand, aktiv am Entzündungsgeschehen beteiligt zu sein.

Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass sich die meisten Patienten in einer Remission befanden, beziehungsweise unter immunsuppressiver Therapie standen (siehe 2.), was sicherlich bremsend auf die Vorgänge des Immunsystems wirkt. Lässt man gesunde Blutmonozyten in vitro zu Makrophagen differenzieren, so steigt die Expression von NALP2 zwar an, die von NALP3

allerdings fällt signifikant ab. Ähnlich verhält es sich beim Ausdifferenzieren der CED - Monozyten:

Es zeigt sich keine Änderung in der NALP2 Expression, aber auch hier sinkt die Genexpression von NALP3 signifikant ab. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den unter 6.1 erklärten Ergebnissen, dass Makrophagen wesentlich mehr NALP2 und NALP3 exprimieren als Blutmonozyten. Es lässt sich also darauf schließen, dass die auswandernden Monozyten die natürlichen Stimuli, die bei der Migration durch die Darmwand und in Form der vielen Antigene im Darmlumen auf sie einwirken, benötigen, um ihre Genexpression an die natürlichen Verhältnisse angepasst, zu regulieren.

Die in vitro - Generierung eines dem intestinalen Makrophagen ähnlichen Phänotyps ist bisher ausschließlich im Sphäroidmodell [17] gelungen. Die in vitro differenzierten Makrophagen zeigen eine Mischform des für Monozyten beziehungsweise Makrophagen typischen Verteilungsmusters an Oberflächenmolekülen. So sind beispielsweise der LPS – Rezeptor CD14, TLRs und T – Zell co – stimulatorische Moleküle stärker exprimiert als auf intestinalen Makrophagen, aber niedriger als auf Monozyten [19, 23]. Sie können also nicht auf die Verhältnisse eines auf „natürlichem Wege“ differenzierten Makrophagen gleichgesetzt werden, sondern dienen als ein Modell, um sich einer Charakterisierung der Immunvorgänge in den Makrophagen der Darmwand anzunähern.

### **6.3 Proteinnachweis von NALP2 und NALP3 mittels Westernblot**

Im Proteinnachweis mittels Westernblot, der zunächst nur für NALP3 durchgeführt wurde, konnte keine für das Protein spezifische Bande bei 118 kDa nachgewiesen werden. Auch bei der maximal eingesetzten Proteinmenge von 40 µg zeigte sich weder bei den Zelllysaten von Blutmonozyten noch bei denen gesunder intestinaler Makrophagen oder CED – Makrophagen die passende Bande. Allerdings bindet der verwendete NALP3 – b Antikörper an vielen unspezifischen Stellen. Es existieren

insgesamt vier verschiedene Antikörper gegen NALP3, a – d für die vier bekannten Isoformen [42]. Der verwendete NALP3 – b Antikörper detektiert das Protein bei 118 kDa und ist der in der Forschung am häufigsten eingesetzte Antikörper, da diese Isoform am häufigsten vertreten ist. Er ist außerdem der einzige kommerziell erhältliche. Dieser verwendete Antikörper detektiert aber auch die short - Variante von NALP3 bei 75 kDa, ihr fehlen die *LRRs*. Dieser NALP3s Isotyp ist laut *Kummer et al. 2006* vor allem in den Zelllysaten von Primärzellen nachzuweisen, während die 118 kDa NALP3 Variante eher in Zelllinien vertreten ist. Aber auch bei 75 kDa ist in den durchgeführten Blots keine Bande zu erkennen. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass es bis heute nur gelungen ist, das NALP3 – Protein im Westernblot aus Zelllysaten nachzuweisen, in denen es überexprimiert wurde, z.B. nach Stimulation mit MDP [52].

Laut *Kummer et al.* kann eine unspezifische Bindung des Antikörpers nicht ausgeschlossen werden. Weiterhin könnte es sich bei den vielen unspezifischen Banden, die der Antikörper detektiert, auch um proteolytische Varianten handeln, die bis heute noch nicht bekannt sind [52].

Letztendlich zeigt sich auch im Verteilungsmuster der NALPs, dass es sich eher schwierig gestaltet, vor allem in Monozyten im Westernblot NALP3 nachzuweisen. Zwar findet man die NALPs in den Zellen des Immunsystems stark vertreten, doch hier hauptsächlich in den Langerhanszellen und den B– und T– Lymphozyten.

Auch in den Makrophagen kann NALP3 nachgewiesen werden, aber nur in geringeren Mengen als in den oben genannten Zellen. Monozyten sollen NALP3 nur in sehr geringen Mengen exprimieren, was die Ergebnisse der Taqman® PCR bestätigen würde [52].

Einfacher nachzuweisen ist NALP3 in den Keratinozyten der Haut oder im Epithel von Mundraum, Ösophagus oder dem weiblichen Reproduktionstrakt. Desweiteren ist im Urothel der ableitenden Harnwege eine hohe NALP3 Expression beschrieben [53]. Auch in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte NALP3 im Epithel des Darmes schon nachgewiesen werden.

All diese Erläuterungen zeigen, dass ein Nachweis des Proteins von NALP3 im Westernblot nicht einfach zu erreichen ist.

Um doch einen Nachweis für NALP3 auf Proteinebene zu erreichen, sollte noch die Immunhistochemie für NALP2 / 3 durchgeführt werden.

## **6.4 Nachweis des NALP2/3 Proteins in Darmmukosa Immunhistochemie**

In der Immunhistochemie zeigte sich eine Färbung für NALP2 und NALP3 in der Mukosa der Schnitte von Biopsien aus den Darmresektaten von M.C. – und C.U. – Patienten.

Da der Isotyp nicht angefärbt war, konnte eine unspezifische Färbung des Antikörpers ausgeschlossen werden. Auch die Kontrollschnitte zeigten keine Färbung für das Protein von NALP2 oder NALP3. Bei diesen Kontrollen handelt es sich um Biopsien gesunder Därme. Allerdings konnte weder für NALP2 noch für NALP3 eine spezifische Lokalisation im Gewebe festgestellt werden. Für eine Reaktion des Antikörpers gegen das Protein NALP2 / 3 im Zytoplasma von Makrophagen würde man die Anfärbung streng vereinzelt in der Lamina propria erwarten. Hier jedoch findet man teilweise eine komplette Anfärbung des Schnittes, vereinzelt sogar mit Epithel. Wie aber schon erwähnt, findet man die NALPs nicht ausschließlich in den Zellen des Immunsystems, sondern auch in Epithel und weiteren Gewebetypen [52].

*Kummer et al.* beschreibt 2007, dass der Antikörper gegen NALP3 auch in der Immunhistochemie nur für eine starke Expression des NALP3 – Moleküls geeignet ist. Darin könnte eine weitere Erklärung für die geringe und unspezifisch verteilte Bindung der Antikörper liegen [52].

## 7.      **Ausblick**

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise, jedoch keine konkreten Nachweise für eine vermehrte Expression von NALP2 oder NALP3 in den intestinalen Makrophagen von CED – Patienten.

Es gestaltete sich bisher schwierig die NALPs in verschiedenen Zell – und Gewebstypen nachzuweisen. Das Hauptaugenmerk der Forschung liegt bis heute eher an der Aufklärung der Struktur und Funktion dieser Moleküle. Da bereits mehrere Erkrankungen aus dem chronisch entzündlichen Formenkreis mit ihrer Ursache in einer Mutation im NALP3 bekannt sind, lohnt es sich auf jeden Fall, diese auch im Rahmen der Forschung an Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mit einzubeziehen.

Interessant ist hier das komplexe Zusammenspiel von NALP2/3 im Inflammasom mit NOD2, einem schon bekannten Suszeptibilitätsgen für M.C., die in einer gemeinsamen Endstrecke zur Ausschüttung der aktiven Form von IL1 $\beta$  führt. Da aber die Mutation im NOD2 bei weitem nicht reichen um die Entstehung von Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu erklären, erscheint es sinnvoll die NALPs als weiteres potentiell fehlerhaftes Glied in einer Kaskade die zu einer übermäßigen Immunreaktion führt, zu sehen.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

CARD	→	caspase activating and recruitment domain
CD	→	cluster of differentiation
CED	→	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CU	→	Colitis ulzerosa
FCAS	→	Familial cold autoinflammatory syndrom
FMF	→	Familiäres Mittelmeerfieber
HLA	→	human leukocyte antigen
i.v.	→	in vitro
ICE	→	Interleukin 1 converting enzyme
Ig	→	Immunglobulin
IL	→	Interleukin
IMAC	→	Intestinale Makrophagen
LPMNZ	→	Lamina propria mononukleäre Zellen
LPS	→	lipopolysaccharid
LRR	→	leucin rich repeats
MC	→	Morbus Crohn
MCP	→	monocyte chemoattractant protein
MDP	→	muramyl dipeptide
MPS	→	mononukleäres Phagozytensystem
MWS	→	Muckle Wells Syndrom
NBS	→	nucleotide binding site
NF $\kappa$ B	→	nuclear factor kappa B
NLR	→	Nod-like receptors
NOD	→	nucleotide-binding oligomerization domain
PAMP	→	pathogen associated molecular pattern
PGN	→	Peptidoglycan
PRR	→	pattern recognition receptor
PYD	→	pyrin domain
TGF	→	transforming growth factor
TLR	→	Toll-like receptor
TNF	→	Tumor-nekrose Faktor

## 9. Abbildungsverzeichnis

### Abb.1: Befallsmuster Morbus Crohn

[www.dccv.de](http://www.dccv.de)

gesehen am 10.12.2008

Deutsche Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa Vereinigung DCCV  
e.V.

### Abb. 2: Koloskopiebefund gesunder Darm (links), MC-Darm (rechts)

Gesund:

[www.evk-witten.de/funktionsbereiche/interdisziplinaere-endoskopie.html](http://www.evk-witten.de/funktionsbereiche/interdisziplinaere-endoskopie.html)

gesehen am 10.12.2008

Evangelisches Krankenhaus Witte

[www.idw-online.de/pages/de/news220813](http://www.idw-online.de/pages/de/news220813)

gesehen am 10.12.2008

Informationsdienst Wissenschaft Pressemitteilung:

Wunderwaffe Joghurt?- Helfen Probiotika bei chronisch  
Entzündlichen Darmerkrankungen?

Universitätsklinikum Ulm 02.08.2007

### Abb. 3: Ausbreitungsmuster Colitis Ulcerosa

siehe Abb. 1

### Abb. 4: Koloskopiebefund normaler Darm (links), UC-Darm (rechts)

normaler Darm siehe Abb. 2

[www.kup.at/journals/abbildungen/gross/4511.html](http://www.kup.at/journals/abbildungen/gross/4511.html)

gesehen am 10.12.2008

Krause&Pachernegg GmbH

Verlag für Medizin und Wissenschaft

J. Gastroenterol Hepatol EAKR 2/2005

F. Siebert: Endoskopie der Ischämischen Colitis

**Abb. 5: NALP3 Molekül**

Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Giardin SE,  
Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in  
interleukin-1 $\beta$

generation

*Clinical and Experimental Immunology*, 147: 227-235, 2006

**Abb.6: Aufbau des Inflammasoms**

siehe Abb. 5

**Abb.7: Aktivierung des Inflammasoms und Bildung von IL-1 $\beta$**

siehe Abb. 5

**Abb. 8: Liganden des NALP3 Inflammasoms**

Ogura Y, Sutterwala FS, Flavell RA,

The Inflammasome: First Line of the Immune Response to Cell  
Stress

*Cell* 126,659-662; August 25, 2006 Elsevier



**Abb. 9: Isolierung von PBMC mittels Ficoll-Paque<sup>®</sup> Plus Technick**

*[http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/tripmacher-robert-2005-05-13/HTML/tripmacher\\_html\\_m4d615387.gif](http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/tripmacher-robert-2005-05-13/HTML/tripmacher_html_m4d615387.gif)*

*<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/tripmacher-robert-2005-05-13/HTML/chapter2.html>*

gesehen am 15.07.2008

**Abb. 10: Prinzip der Taqman-PCR**

*<http://www.edoc.hu-berlin.de/dissertationen/gorzelnia-kerstin-2002-03-18/HTML/>*

gesehen am 15.07.2008

## 10. Literatur

- [1] Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO, Gratzl M.  
Histologie.  
*Springer Verlag*, Berlin, 2000
  
- [2] Lehnert H, Werdan K.  
Innere Medizin-essentials .  
*Thieme Verlag*, Stuttgart, 2006
  
- [3] [www.miami.uni-muenster.de/servelets/DerivateServlet/ Derivate-2052/02\\_arbeiten.pdf](http://www.miami.uni-muenster.de/servelets/DerivateServlet/ Derivate-2052/02_arbeiten.pdf)  
gesehen am 26.11.2007
  
- [4] Böcker W, Denk H, Heitz HP.  
Pathologie.  
*Urban & Fischer Verlag*, München, Jena, April 2004
  
- [5] Schölmerich J.  
Chronisch entzündliche Darmerkrankungen am Ende ihres  
ersten Jahrhunderts.  
*W. Zuckerschwerdt Verlag*, München, 2001
  
- [6] Picco MF, Bayless TM.  
Tobacco Consumption and Disease Duration Are  
Associat With Fistulizing and Stricturing Behaviors in the First 8 Years of  
Crohn`s Disease.  
*Am Journal Gastroenterol*, 98:363-368, 2003.
  
- [7] Regueiro M, Kip KE, Cheung O, Hegazi RA, Plevy S.  
Cigarette smoking and age at diagnosis of inflammatory bowel disease.  
*Inflamm Bowel Dis*, 11:42-47, 2005.

- [8] Karlinger K, Györke T, Makö E, Mester A, Tarjan Z.  
The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease.  
*Europ J Radiology*, 35:154-167, 2000.
- [9] Koutrobakis I, Manousos ON, Meuwissen SG, Pena AS.  
Environmental risk factors in inflammatory bowel disease.  
*Hepatogastroenterology*, 43:381-393, 1996
- [10] Danese S, Fiocchi C.  
Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases.  
*World J Gastroenterol*, 14:4807-4812.
- [11] Bonen DK, Cho JH.  
The Genetics of Inflammatory Bowel Disease.  
*Gastroenterology*, 124:521-536, 2003
- [12] Hugot JP, Cho JH.  
Updates on genetics of inflammatory bowel disease.  
*Curr Opinion Gastroenterol.*, 18:410-415, 2002
- [13] Romagnani P, Annunziato F, Baccari MC, Parronchi P.  
T cells and cytokines in Crohn's disease.  
*Curr Opinion Immun.* 9:793-799, 1997
- [14] Maeda S, Hsu LC, Liu H, Bankston LA, Iimura M, Kagnoff M, Eckmann L, Karin M.  
Nod2 Mutation in Crohn's Disease Potentiates NF- $\kappa$ B Activity and IL-1 $\beta$  Processing.  
*Science*, 307:734-738, 2005

- [15] Janeway CA, Travers D, Walport M, Shlomchik M.  
Immunology.  
*Spektrum Akademischer Verlag GmbH*, Heidelberg, Berlin, 2002
- [16] Smith PD, Ochsenbauer-Jambor C, Smythies LE.  
Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system.  
*Immunological Reviews*, 206:149-159, 2005
- [17] Spöttl T, Hausmann M, Kreutz M, Peuker A, Vogl D, Schölmerich J, Falk W, Andreesen R, Andus T, Herfarth H, Rogler G.  
Monocyte differentiation in intestine-like macrophage phenotype induced by epithelial cells.  
*Journal of Leukozyte Biology*, 70: 241-251, 2001
- [18] Hausmann M, Bataille F, Spöttl T, Schreiter K, Falk W, Schölmerich J, Herfarth H, Rogler G.  
Physiological Role of Macrophage Inflammatory Protein 3- $\alpha$  Induction during Maturation of intestinal Makrophages.  
*J Immunol*, 175:1389-1398, 2005
- [19] Andus T, Rogler G, Daig R, et al.  
The role of macrophages, Inflammatory Bowel Disease.  
*Kluwer Academic Publisher*, Boston, London, 281-297, 1995
- [20] Yao K, Yao T, Iwashita A, Matsui T, Kamachi S.  
Microaggragate of Immunostained Macrophages in Noninflamed Gastroduodenal Mucosa: A new Useful Histological Marker for Differentiating Crohn`s Colitis from Ulcerative Colitis.  
*Am J Gastroenterol*, 59:1967-1973, 2000

- [21] Grimm MC, Pavli P, Van de Pol E, Doe WF.  
Evidence for a CD14<sup>+</sup> population of monocytes in inflammatory bowel disease mucosa-implications for pathogenesis.  
*Clin Exp Immunol*, 100: 291-297, 1995
- [22] Rogler G, Andus T, Aschenbrenner E, Vogl D, Falk W, Schölmerich J, Gross V.  
Alterations of the phenotype of colonic macrophages in inflammatory bowel disease.  
*Eur J Gastroenterol Hepatol*, 9(9):893-899, 1997
- [23] Rogler G, Hausmann M, Spöttl T, Vogl D, Aschenbrenner E, Andus T, Falk W, Schölmerich J, Goss V.  
T-cell co-stimulatory molecules are upregulated on intestinal macrophages from inflammatory bowel disease mucosa.  
*Eur J Gastroenterol Hepatol*, 11(10):110-1111, 1999
- [24] Hausmann M, Obermeier F, Schreiter K, Spöttl T, Falk W, Schölmerich J, Herfarth H, Saftig P, Rogler G.  
Cathepsin D is up-regulated in inflammatory bowel disease macrophages.  
*Clin Exp Immunol*. 136(1): 157-167
- [25] Hausmann M, Spöttl T, Andus T, Rothe G, Falk W, Schölmerich J, Herfarth H, Rogler G.  
Subtractive screening reveals up-regulation of NADPH-oxidase expression in Crohn's disease intestinal macrophages.  
*Clin Exp Immunol*, 125(1): 48-55, 2001
- [26] Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, Knuechel R, Bauerle PA, Schölmerich J, Gross V.  
Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa.  
*Gastroenterol*, 115(2):357-369, 1998

- [27] Grimm MC, Elsbury SK, Pavli P, Doe WF.  
Enhanced expression and production of monocyte chemoattractant protein-1 in inflammatory bowel disease mucosa.  
*J Leucoc Biol*, 59(6): 804-812, 1996
- [28] Spöttl T, Hausmann M, Herlyn M, Gunckl M, Dirmeier A, Falk W, Herfarth H, Schölmerich J, Rogler G.  
Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) inhibits the intestinal-like differentiation of monocytes.  
*Clin Exp Immunol*, 145(1):190-199, 2006
- [29] Meylan E, Tschopp J, Karin M.  
Intracellular pattern recognition receptors in the host response.  
*Nature*, 446: 39-44, 2006
- [30] Tschopp J, Martinon F, Burns K.  
NALPs: A novel protein family involved in inflammation.  
*Nature Rev Molec Cell Biol*. 4:95-104, 2003
- [31] Ferrero-Milani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE.  
Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 $\beta$  generation.  
*Clin and Exp Immunol*. 147: 227-235, 2006
- [32] Chamaillard M, Girardin SE, Viala J, Philpott DJ.  
Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation.  
*Cell. Microbiol*. 5(9):581-592, 2003
- [33] Martinon F, Tschopp J.  
Inflammatory Caspases, Linking an Intracellular Innate Immune System to Autoinflammatory Disease.  
*Cell*. 117(5): 561-574, 2004

- [34] Petrelli V, Papin S, Tschopp J.  
The inflammasome.  
*Curr. Biol.* 15(15): 581-582, 2005
- [35] Tschopp J.  
Pathogen and danger-sensing platforms that trigger apoptosis and inflammation.  
[www.unil.ch/ib/page9499.html](http://www.unil.ch/ib/page9499.html)  
gesehen am 3.12.2007
- [36] Andus T, Daig R, Vogl D, Aschenbrenner E, Lock G, Hollerbach S, Köllinger M, Schölmerich J, Gross V.  
Imbalance of the interleukin 1 system in colonic mucosa-association with intestinal inflammation and interleukin 1 receptor agonist genotyp 2.  
*Gut.*41:651-657, 1997
- [37] Bode H, Schmitz H, Fromm M, Scholz P, Riecken EO, Schulke JD.  
IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , but not IFN- $\gamma$ , IL-6 oder IL-8, are secretory mediators in human distal colon.  
*CYTOKINE.*10(6): 457-465, 1998
- [38] Dinarello CA.  
Unraveling the NALP-3/IL-1 $\beta$  Inflammasome: A Big Lesson from a Small Mutation.  
*Immunity*, 20:243-246, 2004
- [39] Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, Woraratanadharm J, Smith MF, Foley E, Moskaluk CA, Bickston JS, Cominelli F.  
IL-18, a Novel Immunoregulatory Cytokine, is up-Regulated in Crohn's Disease: Expression and Localization in Intestinal Mucosal Cells.  
*The J. of Immun.* 162:6829-6835, 1999

- [40] Sutterwala FS, Ogura Y, Szczepanik M, Tejero ML, Lichtenberger GS, Grant EP, Bertin J, Coyle A, Galan JE, Askenase PW, Flavell R.  
Critical Role for NALP3/CIAS1/ Cryopyrin in Innate and Adaptive Immunity through Its Regulation of Caspase-1.  
*Immunity*,24(3):317-327, 2006
- [41] Kanneganti TD, Özören N, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Franchi L, Whitfield J, Barchet W, Colonna M, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A, Grant EP, Akira S, Nunez G.  
Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3.  
*Nature*, 440:233-236, 2006
- [42] Martinon F, Agostini L, Meylan E, Tschopp J.  
Identification of Bacterial Muramyl Dipeptide as Activator of the NALP3 Cryopyrin Inflammasome.  
*Curr Biol*. 14:1929-1934, 2004
- [43] Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Forster S, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nunez G.  
Host Recognition of Bacterial Muramyl Dipeptide Mediated through NOD2.  
*J Biol Chem*, 278(8):5509-5512, 2003
- [44] Martinon F.  
Detection of humane danger signals by NALP3.  
*J Leucocyte Biol*, 83, 2008
- [45] Ogura Y, Sutterwala FS, Flavell R.  
The Inflammasome: First Line of the Immune Response to Cell Stress.  
*Cell*, 126, 2006



- [46] Bull DM, Bookman MA.  
Isolation and Functional Characterization of Human Intestinal Mucosal Lymphoid Cells.  
*J Clinical Investigation*, 59: 966-974, 1977
- [47] Hausmann M, Kiessling S, Meistermann S, Webb G, Spöttl T, Andus T, Schölmerich J, Herfarth H, Ray K, Falk W, Rogler G.  
Toll-like Receptors 2 and 4 Are Up-regulated During Intestinal Inflammation.  
*Gastroenterology*, 122: 1987-2000, 2002
- [48] Mahida YR, Wu K, Jewell DP.  
Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease.  
*GUT*, 30 (6): 835-838, 1989
- [49] Church LD, Cook GP, McDermott MF.  
Primer: inflammasomes and interleukin 1 $\beta$  in inflammatory disorders.  
*Nature Clinical Practice Rheumatology*, 4: 34-42, 2007
- [50] McAlindon ME, Hawkey CJ, Mahida YR.  
Expression of interleukin 1 $\beta$  and interleukin 1 $\beta$  converting enzyme by intestinal macrophages in health and inflammatory bowel disease.  
*GUT*, 42: 214-219, 1998
- [51] Sari S, Egritas O, Dalgic P.  
The familial Mediterranean fever (MEVF) gene may be a modifier factor of inflammatory bowel disease in infancy.  
*Eur J Pediatr*. Springer Verlag 2007
- [52] Kummer JA, Broekhuizen R, Everett H, Agostini L, Kuijk L, Martinon F, van Bruggen R, Tschopp J.  
Inflammasome Components NALP 1 and show Distinct but Separate Expression Profile in Human Tissues Suggesting a Site-specific Role in the Inflammatory Response.  
*J Histochemistry and Cytochemistry*. 55 (5): 443-452, 2007

## **11. Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. G. Rogler für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit sowie die hervorragende Betreuung und Begleitung der Arbeit. Zudem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. J. Schölmerich für die großzügige Schaffung der Rahmenbedingungen zur Durchführung dieser wissenschaftlichen Arbeit bedanken.

An dieser Stelle möchte ich mich auch herzlich bei Frau Heidi Piberger für die großartige Unterstützung in der Labortätigkeit bedanken.

## 12. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

**Name, Vorname:** Maier, Magdalena Margareta  
**Geburtsdatum/-ort:** 17.07.1983, Weiden in der Oberpfalz  
**Familienstand:** ledig  
**Eltern:** Johann Maier- Dipl. Ing. Werkstofftechnik  
Rosemarie Maier- Industriekauffrau, Technisch  
Zeichnerin  
**Geschwister:** Dr. med. Judith Maier, Klaus Maier, Hans-Ulrich  
Maier

### Schulische Ausbildung:

**1989-1994:** Grundschule Tännesberg  
**1994-1995:** Ortenburg-Gymnasium Oberviechtach  
**1995-1998:** Leininger-Gymnasium Grünstadt, Rheinland-Pfalz  
**1998-2003:** Ortenburg-Gymnasium Oberviechtach  
  
**Mai 2003:** Allgemeinabitur, Ortenburg-Gymnasium,  
Oberviechtach

### Berufliche Ausbildung:

**WS 2003/04-SS 2005:** Vorklinisches Studium an der Universität  
Regensburg  
**13. 09. 2005:** Erster Abschnitt der Arztlichen Prüfung  
**WS 2005/06-SS 2009:** Klinisches Studium an der Universität Regensburg